

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Evaluación de la actividad larvica de extractos vegetales y  
nanopartículas de plata sintetizadas a partir de extractos vegetales de  
especies nativas del Ecuador contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae).**

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciada  
en Ciencias Biológicas**

**BIANCA DOMINIQUE MOREJÓN VITERI**

**Quito, 2017**

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la Srta. Bianca Dominique Morejón Viteri ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dr. Marco Neira Oviedo  
Director de la Disertación  
Quito, de junio de 2017

## **DEDICATORIA**

A mi Maye, el ángel que me acompaña todos los días.

A mis padres Pablo y Fernanda, mi inspiración, mi fuerza y mi soporte.

A mi hermana Titi, mi mejor amiga.

A Jair, mi gran amor.

A mis amigos, especímenes únicos e incondicionales.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, le agradezco a Dios porque me permitió existir en este pedacito de la historia; porque es mi escudo, mi fuerza y mi refugio. Su amor y verdad son el motor de mi vida.

No podría jamás dejar de agradecerles a mis padres Pablo y Ma. Fernanda por ser mi fuente de amor y de apoyo constante e incondicional. Reconozco todos los sacrificios que han hecho por mí y por mi hermana, porque siempre pusieron nuestro bienestar por encima de todo. De la misma forma, le agradezco a mi hermana Titi por siempre creer en mí, por darme una perspectiva diferente sobre las situaciones y sobre todo porque siempre ha estado conmigo. A ustedes tres, les agradezco por exhortarme a cumplir mis sueños, apoyarme cuando escogí una carrera tan inusual y aguantar las tantas peculiaridades que tuvieron que vivir conmigo a lo largo de mis años como estudiante.

Estoy agradecida con Jair Jiménez por todo su amor, por su asistencia en varias de mis aventuras para coleccionar insectos y plantas, y estar dispuesto a caminar el resto de su vida con una “científica loca”. Espero que algún día puedas sentir que tanto mis derrotas como mis victorias son también tuyas.

Por otro lado, quiero agradecerle al Dr. Marco Neira, mi director de tesis, por haber creído en mi potencial para ser científica, por ser mi maestro y mi guía desde que empecé como su becaria hasta este momento en el que finalizo mi trabajo de titulación bajo su tutela. A Ma. Fernanda Pilaquinga, Flavia Domenech y Danny Ganchala les agradezco por proveerme de las sustancias probadas en esta investigación.

Les agradezco a mis amigos de “La Banca”, por todas las experiencias que vivimos juntos dentro y fuera de clases, en las cuales nos hemos apoyado mutuamente. Todas ellas han creado un lazo de amistad que perdurará en el tiempo. De todos ustedes, mi agradecimiento es especial para Ricardo, quien es mi primer amigo en la facultad y el mejor compañero de equipo. Es importante para mí resaltar su ayuda precisa para identificar, coleccionar y montar los especímenes vegetales utilizados en este trabajo.

Finalmente, expreso mi agradecimiento hacia el Centro de Investigación para la Salud en América Latina por permitirme utilizar sus instalaciones y hacerme parte de su equipo de trabajo, y hacia la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por su excelente educación y particularmente por financiar este proyecto en su totalidad.

Mi carrera universitaria ha culminado; esta etapa tan maravillosa que me ha formado tanto a nivel profesional como personal terminó. Como agradecimiento por todo lo que ustedes han hecho por mí y en mí, prometo hacer mi mayor esfuerzo para continuar con mi formación académica y ser una excelente profesional, responsable y honesta pero sobre todo estar siempre al servicio de quienes más lo necesitan.

## TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN .....	1
2. ABSTRACT .....	2
3. INTRODUCCIÓN .....	3
3.1. ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR MOSQUITOS .....	3
3.2. BIOLOGÍA DE <i>A. aegypti</i> : VECTOR DE LAS PRINCIPALES ARBOVIROSIS HUMANAS .....	3
3.3. METODOLOGÍAS DE CONTROL DE <i>A. aegypti</i> .....	4
3.4. USO DE LARVICIDAS PARA EL CONTROL POBLACIONAL DE <i>A. aegypti</i> .	5
3.5. LARVICIDAS DE ORIGEN BOTÁNICO Y NANOPARTÍCULAS DE PLATA .	6
3.6. <i>Solanum mammosum</i> y <i>Ambrosia arborescens</i> : ESPECIES ECUATORIANAS CON POTENCIAL ACTIVIDAD LARVICIDA .....	7
3.7. OBJETIVOS .....	9
3.7.1. OBJETIVO GENERAL	
3.7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	10
4.1. COLECCIÓN DE ESPECÍMENES VEGETALES .....	10
4.2. SÍNTESIS DE EXTRACTOS VEGETALES Y AgNPs .....	10
4.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA .....	11
4.3.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO .....	11
4.3.2. BIOENSAYOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA .....	11
4.4. ANÁLISIS DE LOS DATOS .....	13
4.4.1. DETERMINACIÓN DE LA CL <sub>50</sub> .....	13
4.4.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	14
5. RESULTADOS .....	15
5.1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA DE EXTRACTOS VEGETALES .....	15
5.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA DE NANOPARTÍCULAS .	15
5.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA DE <i>S. mammosum</i> .....	16
5.4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA DE <i>A. arborescens</i> .....	16
6. DISCUSIÓN .....	17

<b>6.1. EXTRACTOS VEGETALES DE SOLANÁCEAS UTILIZADOS COMO LARVICIDAS DE <i>A. aegypti</i> Y OTRAS ESPECIES DE MOSQUITOS DE IMPORTANCIA MÉDICA</b>	<b>17</b>
<b>6.2. EXTRACTOS VEGETALES DE ASTERÁCEAS UTILIZADOS COMO LARVICIDAS DE <i>A. aegypti</i> Y OTRAS ESPECIES DE MOSQUITOS DE IMPORTANCIA MÉDICA</b>	<b>19</b>
<b>6.3. AgNPs DE SOLANÁCEAS UTILIZADAS COMO LARVICIDAS DE <i>A. aegypti</i> Y OTRAS ESPECIES DE MOSQUITOS DE IMPORTANCIA MÉDICA</b>	<b>21</b>
<b>6.4. AgNPs DE ASTERÁCEAS UTILIZADAS COMO LARVICIDAS DE <i>A. aegypti</i> Y OTRAS ESPECIES DE MOSQUITOS DE IMPORTANCIA MÉDICA</b>	<b>22</b>
<b>6.5. CONSIDERACIONES EN CUANTO LA APLICABILIDAD DE NANOPARTÍCULAS PARA EL CONTROL DE VECTORES</b>	<b>23</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>25</b>
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>26</b>
<b>9. FIGURAS</b>	<b>34</b>
<b>10. TABLAS</b>	<b>41</b>
<b>11. ANEXOS</b>	<b>49</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Voucher de <i>Solanum mammosum</i> L. depositado en el Centro de Investigación para la Salud en América Latina .....	34
Figura 2. Voucher de <i>Ambrosia arborescens</i> Mill. depositado en el Centro de Investigación para la Salud en América Latina .....	35
Figura 3. Esquema de bioensayo para determinar la concentración letal media de extractos vegetales o nanopartículas de plata en las larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	36
Figura 4. Actividad larvicida de extractos vegetales acuosos obtenidos a partir de <i>Solanum mammosum</i> y <i>Ambrosia arborescens</i> contra <i>Aedes aegypti</i> .....	37
Figura 5. Actividad larvicida de nanopartículas de plata sintetizadas a partir de los extractos vegetales de <i>Solanum mammosum</i> y <i>Ambrosia arborescens</i> y nanopartículas control contra <i>Aedes aegypti</i> .....	38
Figura 6. Actividad larvicida de extractos vegetales y nanopartículas de plata obtenidas a partir de <i>Solanum mammosum</i> y nanopartículas control contra <i>Aedes aegypti</i> .....	39
Figura 7. Actividad larvicida de extractos vegetales y nanopartículas de plata obtenidas a partir de <i>Ambrosia arborescens</i> y nanopartículas control contra <i>Aedes aegypti</i> .....	40

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Valores probit de extractos vegetales y nanopartículas de plata obtenidas a partir de <i>Solanum mammosum</i> y <i>Ambrosia arborescens</i> y nanopartículas control contra las larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	41
Tabla 2. Registro de mortalidad de larvas de <i>Aedes aegypti</i> expuestas a diferentes concentraciones de extracto vegetal obtenido a partir de <i>Solanum mammosum</i> y concentraciones letales medias calculadas por bioensayo .....	42
Tabla 3. Registro de mortalidad de larvas de <i>Aedes aegypti</i> expuestas a diferentes concentraciones de extracto vegetal obtenido a partir de <i>Ambrosia arborescens</i> y concentraciones letales medias calculadas por bioensayo .....	43
Tabla 4. Registro de mortalidad de larvas de <i>Aedes aegypti</i> expuestas a diferentes concentraciones de nanopartículas de plata sintetizadas a partir de <i>Ambrosia arborescens</i> y concentraciones letales medias calculadas por bioensayo .....	44
Tabla 5. Registro de mortalidad de larvas de <i>Aedes aegypti</i> expuestas a diferentes concentraciones de nanopartículas de plata sintetizadas a partir de <i>Ambrosia arborescens</i> y concentraciones letales medias calculadas por bioensayo .....	45
Tabla 6. Registro de mortalidad de larvas de <i>Aedes aegypti</i> expuestas a diferentes concentraciones de nanopartículas de plata control sintetizadas a partir de d-glucosa y almidón y concentraciones letales medias calculadas por bioensayo .....	46
Tabla 7. Porcentaje de mortalidad en larvas de <i>Aedes aegypti</i> expuestas a diferentes concentraciones de extracto vegetal acuoso y nanopartículas de plata obtenidos a partir de <i>Solanum mammosum</i> y <i>Ambrosia arborescens</i> .....	47



## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1.	Régimen de alimentación larval de <i>Aedes aegypti</i> desde L1 hasta L3 .....	49
Anexo 2.	Script para análisis probit en R .....	50
Anexo 3.	Script para t-test para muestras independientes .....	51
Anexo 4.	Script para ANOVA y prueba de significación (post hoc) de HSD Tukey ...	52

## 1. RESUMEN

El gran impacto global de las enfermedades transmitidas por mosquitos representa un importante problema de salud pública que debe ser prevenido, controlado y tratado constantemente. Recientemente, la transmisión ha aumentado en áreas urbanas debido al rápido crecimiento poblacional, la globalización, el transporte moderno, los efectos del cambio climático y el aumento de la resistencia del mosquito a insecticidas. El mosquito *Aedes aegypti* es el vector primario de las infecciones de dengue, chikungunya y Zika a nivel mundial. Debido a que no existen vacunas o medicinas efectivas para la prevención y/o tratamiento de estas patologías, el control vectorial es la principal estrategia para reducir su transmisión. Para controlar el tamaño de las poblaciones de *Aedes*, la herramienta más utilizada es la aplicación de insecticidas sintéticos y a pesar de su efectividad, su uso extensivo ha producido altos costos operativos y efectos colaterales adversos.

Los insecticidas derivados de plantas representan una alternativa de biocontrol eco-amigable, costo-efectiva y segura. El presente estudio evalúa la actividad larvicida de los extractos frutales de *Solanum mammosum*, extractos foliares de *Ambrosia arborescens* y nanopartículas de plata (AgNPs) sintetizadas utilizando los extractos acuosos de estas plantas contra las larvas de tercer estadio de *A. aegypti*. Para esto, las larvas fueron expuestas a un gradiente de concentraciones de extractos vegetales y AgNPs durante 24 horas. Los ensayos de laboratorio muestran que las AgNPs obtenidas a partir de las dos plantas fueron significativamente más tóxicas para las larvas de mosquito que los extractos vegetales, siendo las AgNPs de *S. mammosum* las de mayor toxicidad.

Estos resultados sugieren que tanto los extractos vegetales como las AgNPs obtenidas a partir de *S. mammosum* y *A. arborescens* tienen el potencial para desarrollarse como herramientas alternativas apropiadas para el control de este insecto vector de arbovirus.

### **Palabras clave:**

*Aedes aegypti*, control vectorial, extracto acuoso, larvicidas, nanopartículas de plata.

## 2. ABSTRACT

Due to the large toll they take on individual and societies, mosquito borne diseases represent a major challenge for global public health. To reduce this toll, mosquito borne diseases must be constantly prevented, controlled and treated. Recently, transmission has increased in urban areas due to the fast population growth, globalization, modern transportation, the effects of climate change and increasing resistance to pesticides in mosquito populations.

The mosquito species *Aedes aegypti* is the primary vector of dengue, chikungunya and Zika infections worldwide. Since effective vaccines or drugs are not available for the prevention and/or treatment of these pathologies, vector control has been adopted as the main approach to reduce their transmission. To control *Aedes* populations, the most commonly used tool is the application of chemical insecticides and, despite their effectiveness, indiscriminate use of these chemicals has led to high operational costs, appearance of resistant populations, and adverse non-target effects.

Plant-derived insecticides may be an eco-friendly, cost effective and safe biocontrol alternative. The present study was carried out to evaluate the larvicidal activity of fruit extracts of *Solanum mammosum*, leaf extracts of *Ambrosia arborescens* and green-synthesized silver nanoparticles (AgNPs) using aqueous extracts obtained from these plants against third instar larvae of *A. aegypti*. To test this, larvae were exposed to increasing concentrations of plant extracts and AgNPs for 24 h. In laboratory assays, AgNPs of both plants were more toxic than the plant extracts, with *S. mammosum* AgNPs displaying the highest levels of toxicity. These results suggest that extracts of both *S. mammosum* and *A. arborescens*, as well as green-synthesized silver nanoparticles produced from those extracts, have the potential to be developed into suitable alternative tools useful for the control of *A. aegypti* populations.

**Keywords:**

*Aedes aegypti*, aqueous extracts, larvicides, silver nanoparticles, vector control.

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1. ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR MOSQUITOS

Durante las últimas décadas el cambio climático, el crecimiento poblacional en áreas urbanas, la deforestación, la invasión de hábitats naturales y el aumento de resistencia a insecticidas han contribuido en la aparición, reemergencia y dispersión de muchas enfermedades infecciosas, incluyendo aquellas que son transmitidas por insectos (Institute of Medicine, 2008). De estas, las enfermedades transmitidas por mosquitos se mantienen endémicas en más de 100 países tropicales en vías de desarrollo, y su control representa una meta importante para mejorar la salud a nivel mundial (Organización Mundial de la Salud, 2016).

En el caso de Ecuador, una gran parte de la población se encuentra en riesgo de adquirir alguna de las varias enfermedades transmitidas por mosquitos existentes en nuestro país. Por ejemplo, según los datos del Ministerio de Salud el 70% del territorio ecuatoriano tiene condiciones sociales, económicas, ambientales y culturales que favorecen la presencia de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2013), mosquito vector de los agentes etiológicos responsables de enfermedades como el dengue, fiebre amarilla, chikungunya y Zika.

#### 3.2. BIOLOGÍA DE *Aedes aegypti*: MOSQUITO VECTOR DE LAS PRINCIPALES ARBOVIROSIS HUMANAS.

*A. aegypti* es una especie de mosquito originaria de África que pertenece al subgénero *Stegomyia*. Estos insectos viven dentro de asentamientos humanos y su distribución se extiende a lo largo y ancho de las regiones tropicales y subtropicales del planeta (Cook y Zumla, 2008). La hembra de *A. aegypti* generalmente se convierte en vector de una arbovirosis después de alimentarse de la sangre de una persona infectada. Una vez que un mosquito hembra ha adquirido la capacidad de transmitir una enfermedad arboviral, portará el virus por el resto de su vida, y lo transmitirá a otra persona cada vez que se alimente de sangre (Chamberlain y Sudia, 1961; Sardar, Rana y Chattopadhyay, 2015).

*A. aegypti*, en su condición de insecto holometábolo, posee un complejo ciclo de vida que incluye etapas acuáticas y terrestres. Brevemente, entre uno y tres días después de que se ha alimentado de sangre, la hembra deposita los huevos en las superficies húmedas de contenedores de agua, los cuales eclosionan cuando aumenta el nivel de agua hasta ser sumergidos, produciendo larvas de primer estadio. Durante los siguientes días, las larvas se alimentan de materia orgánica, lo que les permitirá crecer y desarrollarse a lo largo de cuatro estadios larvales. Después del cuarto estadio larval, la metamorfosis inicia y las larvas se transforman en pupas, las cuales no se alimentan (Centers for Disease Control and Prevention, 2012). Una vez formado el cuerpo del adulto dentro de la pupa, los mosquitos emergen por encima de la superficie del agua y pocos minutos después son capaces de volar. Las hembras y machos adultos se reconocen por la frecuencia del movimiento de las alas para aparearse (Arthur, Emr, Wyttenbach y Hoy, 2014) y el ciclo inicia nuevamente

### **3.3. METODOLOGÍAS DE CONTROL DE *A. aegypti***

Debido a la ausencia de vacunas comerciales para la gran mayoría de las enfermedades transmitidas por *A. aegypti*, la prevención de estas se da esencialmente mediante el control cuando la hembra fertilizada se alimenta de sangre para que los huevos maduren del tamaño de las poblaciones de este insecto. La metodología de control primaria incluye el saneamiento ambiental y reducción de fuentes a través de la eliminación de contenedores artificiales de crianza, la aplicación de insecticidas dentro del área peridomiciliaria e intradomiciliaria para el control de adultos y también el uso de larvicidas para el control de los estadios inmaduros del mosquito (World Health Organization y Special Programme for Tropical Disease Research, 2009). De estas, la herramienta más utilizada para realizar este control es la aplicación a nivel aéreo de insecticidas químicos como organofosforados (inhiben a la acetilcolinesterasa en la sinapsis, de tal manera que el impulso nervioso se vuelve constante), carbamatos (actúan de la misma forma que los organofosforados), organoclorados (alteran el funcionamiento de los canales de sodio y los canales GABA) y piretroides (alteran el funcionamiento de canales de sodio en neuronas) (Bisset, Rodríguez y Fernández, 2006). Inicialmente, estos agentes químicos lograron reducir las poblaciones de mosquitos; sin embargo, su uso recurrente y en algunos casos indiscriminado ha resultado en una reducción en la eficacia de los mismos, debido a la aparición de poblaciones de insectos resistentes a su efecto que ha aumentado dramáticamente durante los últimos años (Govindarajan, Jebanesan y Reetha, 2005).

### 3.4. USO DE LARVICIDAS PARA EL CONTROL POBLACIONAL DE *A. aegypti*

Los larvicidas juegan un papel importante en el control de las poblaciones de mosquitos en sus sitios de crianza, de tal manera que no puedan llegar a la etapa adulta y por lo tanto, no puedan ni dispersarse ni transmitir enfermedades. Estos productos se encuentran en varios tipos de formulaciones, tanto en presentación sólida (tabletas, pellets, gránulos, briquetas) como líquida. Dentro de los larvicidas más utilizados están los inhibidores de crecimiento (compuestos químicos que interfieren con el sistema endócrino del insecto, inhibiendo así el crecimiento, desarrollo y maduración de la larva) (da Silva & Mendes, 2007), insecticidas bacterianos como *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) y *Bacillus sphaericus* (sus esporas contienen toxinas que dañan y paralizan el intestino de las larvas que las ingieren, produciendo la muerte por inanición) (Poopathi y Abidha, 2010), e insecticidas organofosforados como Temephos (compuestos que interfieren en la transmisión del impulso nervioso, bloqueando así cualquier actividad del sistema nervioso central) (Bisset, Rodríguez y Fernández, 2006). Cabe mencionar que el uso de Temephos ha ido menguando desde el 2008, debido al proceso de cancelación de su registro como pesticida emitido por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés) (Environmental Protection Agency, 2011).

Como es evidente, el uso de larvicidas se ha limitado también en su mayoría a compuestos químicos y su aplicación en estanques, pozos y otros cuerpos de agua podría potencialmente afectar a la salud de peces larvívoros y de otras especies, incluyendo a los seres humanos (Hurst, Kay, Ryan y Brown, 2007). Por todo esto, el desarrollo de nuevos larvicidas biodegradables, de bajo impacto ecológico y específicos para mosquitos es de vital importancia. Los larvicidas derivados de organismos biológicos responderían a la necesidad actual debido a su toxicidad reducida, y a una baja contaminación ambiental en general (Thiyagarajan, Kumar, Kovendan y Murugan, 2014).

### 3.5. LARVICIDAS DE ORIGEN BOTÁNICO Y NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Explorar la diversidad florística es una de las alternativas más efectivas para obtener larvicidas de origen botánico, simples y sustentables. A diferencia de los insecticidas convencionales, los cuales normalmente están basados en un solo ingrediente activo, la composición de los derivados botánicos incluye varias combinaciones de compuestos químicos que actúan conjuntamente en diferentes procesos biológicos, de tal manera que existe una baja probabilidad de que los mosquitos desarrollen resistencia a tales sustancias (Benelli, Caselli y Canale, 2016). A pesar de que el control con larvicidas de origen vegetal representa un método sustentable, sobre todo para áreas rurales o de bajos recursos económicos, se requieren altas concentraciones de la planta para lograr el efecto (Ghosh, Chowdhury y Chandra, 2012), lo cual no es óptimo si se plantea producir y utilizar estos larvicidas a grandes escalas.

Una alternativa interesante a los larvicidas estrictamente botánicos, es la producción de nanopartículas de plata (AgNPs) sintetizadas a partir de extractos vegetales (Priyadarshini et al., 2012). Esta tecnología cuenta con las propiedades microbiocidas de la plata, su resistencia a la oxidación y una alta efectividad debido a su favorable relación superficie/volumen producida por un tamaño de partícula muy reducido (1-100 nm) (Borase et al., 2013), en combinación con la actividad larvicida de una planta determinada. De esta manera, el efecto insecticida puede alcanzarse con concentraciones muy bajas de estas nanopartículas que, además, tienen la capacidad de biodegradarse (Muthukumaran, Govindarajan, Rajeswary y Hoti, 2015), por lo que se minimiza la acumulación de residuos peligrosos en el ambiente.

La actividad larvicida de las AgNPs sintetizadas a partir de extractos vegetales contra las larvas de *A. aegypti* ha sido ampliamente estudiada y documentada (Jayaseelan et al., 2011; Rajakumar y Rahuman, 2011; Santhoshkumar et al., 2011). Sin embargo, no existen reportes científicos sobre la utilización de plantas nativas del Ecuador para este propósito, por lo que es pertinente evaluar el potencial que presentan nuestras plantas para ser utilizadas como larvicidas. Afortunadamente, la literatura científica disponible lista varias especies con cualidades que sugieren un potencial uso como fuente de insecticidas naturales. La Enciclopedia de Plantas Útiles del Ecuador reporta que en el territorio nacional existen 34 especies de plantas con propiedades insecticidas. Aunque estas especies se distribuyen en

16 familias botánicas, la mayoría (58%) pertenecen a las familias Asteraceae, Solanaceae y Fabaceae (De La Torre, Navarrete, Muriel, Macía y Balslev, 2008). Las dos especies que se escogieron para evaluar su actividad larvica en el presente estudio fueron las que presentan la mayor cantidad de registros: *Solanum mammosum* y *Ambrosia arborescens*.

### **3.6. *Solanum mammosum* y *Ambrosia arborescens*: ESPECIES ECUATORIANAS CON POTENCIAL ACTIVIDAD LARVICIDA**

*Solanum mammosum* (L.) es una especie nativa y cultivada perteneciente a la familia Solanaceae cuya distribución en el Ecuador se extiende entre los 0-500 m.s.n.m en las regiones Costa y Sierra (Jørgensen & León-Yáñez, 1999). Su hábito se presenta como hierba terrestre o subarbusto, de tallo espinoso, hojas simples, pubescentes en el haz y en el envés, bordes medianamente hendidos, espinas conspicuas sobre las nervaduras, ápice acuminado. Sus inflorescencias en racimo poseen flores pedunculadas, de cáliz verde-amarillento con 5 sépalos y corola lila con 5 pétalos. Los frutos son tipo baya de forma cónica con lóbulos en la parte proximal, de color amarillo oro en la maduración y de 5 a 6 cm de longitud (Miller, 1969).

Varias etnias del país como los Cofán, Siona y Kichwas del Oriente la utilizan para matar ratones, eliminar hongos y ectoparásitos de las gallinas y tratar la sarna en perros. Esta planta puede considerarse potencialmente insecticida, pues existen reportes de que sus frutos sirven "...para matar artrópodos, cucarachas principalmente, además de otros invertebrados pequeños" (De La Torre et al., 2008). Cada etnia la denomina dependiendo de su lengua, sin embargo se la conoce más comúnmente como "atallpa hanpina" o "chuchu laran" en kichwa y como "curar gallinas", "estacudo", "teta de vaca" o "torito" en castellano.

*Ambrosia arborescens* (Mill.), también conocida como *Franseria artemisioides*, es una especie nativa del Ecuador perteneciente a la familia Asteraceae que se encuentra en todas las provincias andinas de la Sierra, entre los 2 000 y 3 500 m.s.n.m (Jørgensen & León-Yáñez, 1999). Su hábito se presenta como subarbusto, arbusto o arbolito; presenta un tallo cilíndrico erguido, hojas alternas, pinnatisectas, lanceoladas, el haz es glabro y el envés blanquecino. Sus inflorescencias son panículas agrupadas en cabezuelas de color amarillo poco intenso que al dar fruto se presentan en forma de aquenios. Todas las estructuras de la



planta presentan un olor pungente y poco agradable mientras que en los tallos se observa un látex acuoso de sabor amargo (Ruales, 2013).

Esta especie vegetal es especialmente utilizada por los Kichwas de la Sierra, quienes la denominaron “marku” o “marku yura”. En castellano, sus nombres comunes son “altamira”, “altamisa”, “altomiso”, “artemisia”, “mano de marco” o “marco”. Distintas partes de la planta se utilizan como aditivo de alimentos, forraje, medicina y elaboración de artesanías y herramientas. La Enciclopedia de Plantas Útiles del Ecuador reporta que “las hojas y ramas se usan como insecticida, para eliminar principalmente pulgas, piojos, moscos y chinches de las viviendas” (De La Torre et al., 2008).

En ese contexto, este trabajo intenta explorar el efecto producido tanto de los extractos vegetales de estas dos especies como de la combinación de los mismos con AgNPs, con el objetivo de potenciar su actividad insecticida, reduciendo así las dosis requeridas para su eventual utilización.

### **3.7. OBJETIVOS**

#### **3.7.1. GENERAL**

Determinar el efecto insecticida contra los estadios larvales de *A. aegypti* de los extractos vegetales (puros y en combinación con AgNPs) de dos especies de plantas nativas del Ecuador.

#### **3.7.2. ESPECÍFICOS**

- Evaluar la actividad larvicida contra *A. aegypti* de los extractos de dos especies vegetales nativas del Ecuador.
- Evaluar el efecto larvicida contra *A. aegypti* de AgNPs sintetizadas a partir de los extractos de dos especies vegetales nativas del Ecuador.
- Comparar el potencial larvicida de los extractos vegetales puros con el potencial larvicida de estos mismos extractos en combinación con AgNPs.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. COLECCIÓN DE ESPECÍMENES VEGETALES

Los frutos de *Solanum mammosum* fueron colectados en la provincia de Pichincha, cantón Puerto Quito, en el recinto Marianitas, a una altitud de 135 m.s.n.m ( $0^{\circ}05'46.3''\text{N}$ ,  $79^{\circ}07'33.5''\text{O}$ ).

Las hojas de *Ambrosia arborescens* utilizados para realizar esta investigación fueron colectadas en una zona agrícola de la provincia de Pichincha, cantón Quito, parroquia de Calacalí a una altitud de 2980 m.s.n.m ( $78^{\circ}30'55.7''\text{S}$ ,  $00^{\circ}00'32.7''\text{O}$ ).

Adicionalmente, se prepararon vouchers de *S. mammosum* (figura 1) y *A. arborescens* (figura 2) para su confirmación taxonómica. Estos vouchers se depositaron en el Centro de Investigación para la Salud en América Latina (CISeAL) de la PUCE.

### 4.2. SÍNTESIS DE EXTRACTOS VEGETALES Y AgNPs

Tanto la obtención de los extractos vegetales como la síntesis de nanopartículas fueron llevadas a cabo por el laboratorio de Nanotecnología de la Escuela de Ciencias Químicas de la PUCE. La extracción vegetal se realizó mediante ultrasonido, utilizando agua destilada como solvente. Una fracción del extracto obtenido se utilizó para la obtención de nanopartículas de plata mediante un proceso de “síntesis verde”, en el cual se utiliza un agente biológico (en este caso, el extracto vegetal) para reducir una sal metálica hasta producir nanopartículas estables (Kameswara, Giri, Pal, Mishra y Upadhyay, 2016).

Luego del proceso de síntesis, la presencia de nanopartículas del tamaño apropiado (30 a 50 nm de diámetro) fue verificada mediante espectrofotometría UV/Vis y Microscopía Electrónica de Barrido con detector de rayos X (SEM-EDX) (Domenech, 2017).

### 4.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA

#### 4.3.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Para realizar este trabajo se utilizó una cepa ecuatoriana de *A. aegypti* proveniente de la ciudad de Puerto Francisco de Orellana (denominada Ae. aeg COCA02), fundada a partir de 2 colecciones (colección 1: 00°29'15.2"S, 76°59'27.8"O; colección 2: 00°29'22.0"S, 76°59'34.7"O), la cual ha sido mantenida en el insectario de la unidad de entomología médica del CISEAL desde el año 2015 (Aguirre, 2016). Todos los ensayos, mantenimiento y reposición de la cepa usada en este estudio se realizó dentro de las instalaciones y utilizando el equipamiento de dicha institución.

#### 4.3.2. BIOENSAYOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD LARVICIDA

Para evaluar la actividad larvicida de los extractos vegetales y las AgNPs, se realizaron bioensayos utilizando los protocolos propuestos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el efecto (World Health Organization, 2005), con modificaciones mínimas (descritas a continuación).

**Eclosión y crianza:** Huevos de *A. aegypti* se eclosionaron en bandejas plásticas con 250 mL de agua previamente hervida y enfriada. Los huevos no eclosionados fueron retirados a las 24 horas exactas de haber sido ubicados en el agua.

Para obtener un crecimiento larval homogéneo se estandarizaron las condiciones de crianza. Las condiciones ambientales se mantuvieron dentro del rango de temperatura de  $28 \pm 1$  °C, humedad de  $80 \pm 10$  % y fotoperiodo de 12 horas luz, 12 horas oscuridad dentro del insectario del CISEAL. Asimismo, se estandarizó la cantidad de comida para larvas (alimento para peces de acuario molido) colocada cada día. Para el efecto, se utilizó como referencia el régimen alimentario descrito por Carvalho et al. (2014). El régimen que se siguió es el descrito en el anexo 1.

Aproximadamente cuatro días después de la eclosión, las larvas alcanzaron el estadio L3, que es la edad larval recomendada para realizar ensayos larvicidas de acuerdo a la OMS (World Health Organization, 2005).

**Bioensayos:** En estos ensayos, grupos de larvas en estadio L3 se sometieron a un rango de concentraciones del material a evaluar (extracto vegetal o AgNPs) durante 24 horas. Durante este período los especímenes no recibieron ningún alimento extra.

Cada bioensayo constó de una unidad experimental por concentración, y un grupo control. La unidad experimental consistió de cuatro réplicas. Cada réplica constó de 25 larvas en estadio L3, ubicadas en un contenedor y expuestas a la solución de prueba. El grupo control fue similar a una unidad experimental, pero estuvo expuesto únicamente a agua destilada. El bioensayo se repitió cinco veces, como se observa en la figura 3.

Para la obtención de la CL<sub>50</sub> (concentración letal media, concentración del material en agua que se estima letal para el 50% de los organismos de ensayo) se creó un gradiente de cuatro concentraciones y a partir de los resultados de cada bioensayo, se construyó una curva de regresión. El rango de concentraciones utilizado se determinó en base a valores reportados en la literatura (Benelli, 2016; Ghosh et al, 2012) y a ensayos preliminares, de tal manera que para realizar los ensayos con los extractos vegetales tanto de *S. mammosum* como de *A. arborescens*, el rango utilizado fue de 1500, 3000, 4500 y 6000 ppm. En el caso de las AgNPs, las concentraciones obtenidas para *S. mammosum* fueron de 0.05, 0.06, 0.07 y 0.08 ppm, mientras que para *A. arborescens* fueron de 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 ppm. Para las AgNPs control se utilizaron concentraciones de 200, 300, 400 y 500 ppm. En todos los casos, estas concentraciones produjeron entre el 10 y el 100% de mortalidad.

Durante cada bioensayo las larvas fueron expuestas al material en evaluación durante 24 horas. Acto seguido, se registró el número de larvas muertas en cada grupo. Siguiendo los lineamientos de la OMS (World Health Organization, 2005), “las larvas moribundas son consideradas como muertas para calcular el porcentaje de mortalidad. Las larvas muertas son aquellas que no pueden ser inducidas al movimiento al tocarlas con una aguja, mientras que larvas moribundas son aquellas incapaces de ascender a la superficie o que no muestran una reacción cuando se produce movimiento en el agua. Las larvas que lleguen a pupar durante el periodo de prueba no podrán ser consideradas dentro de la misma. Si más del 10%

de las larvas del grupo control llegaran a pupar en el periodo experimental, la prueba deberá ser desechada y repetida. Si la mortalidad de los grupos control se encuentra entre el 5 y 20%, la mortalidad del grupo tratado deberá ser corregida de acuerdo a la fórmula de (Abbott, 1987)”.

$$Mortality (\%) = \frac{X - Y}{X} 100$$

Donde X= porcentaje de supervivientes en el control y Y= porcentaje de supervivientes en el grupo tratado.

Con el objetivo de diferenciar los efectos del extracto vegetal y de la plata reducida (los dos componentes presentes en las nanopartículas de plata), se realizaron bioensayos con nanopartículas control sintetizadas a partir de una solución de d-glucosa y almidón (llamadas “AgNPs desnudas”, por no estar asociadas con extractos vegetales). Experimentos preliminares mostraron que ni la glucosa ni el almidón presentan efectos tóxicos para las larvas de *A. aegypti* (datos no mostrados). Debido a esto, el uso de estas AgNPs desnudas hace posible el determinar el efecto larvicida atribuible puramente a la plata reducida, diferenciándolo del efecto atribuible a la combinación de AgNPs con los extractos vegetales.

Para estos ensayos se utilizó la misma metodología, obteniendo la CL<sub>50</sub> para este tipo de AgNPs. Posteriormente, se procedió a comparar las medidas de concentración letal media para las AgNPs experimentales vs. control.

#### **4.4. ANÁLISIS DE LOS DATOS**

##### **4.4.1. DETERMINACIÓN DE LA CL<sub>50</sub>**

La determinación de la CL<sub>50</sub> se realizó de acuerdo al protocolo propuesto por la OMS (World Health Organization, 2005). En cada unidad experimental los resultados de las cuatro réplicas se agruparon para el análisis. Los valores de CL<sub>50</sub> en partes por millón (ppm) fueron calculados a través de un análisis Probit (Finney, 1971). Para el mismo, se empleó el paquete “MASS” (Venables & Ripley, 2002) del software libre R (R Core Team, 2013) (script en el anexo 2). La desviación estándar y los intervalos de confianza (IC) al 95% (rango de valores, cuya distribución es normal y en el cual se encuentra, con una probabilidad del 95%, el valor

real de la  $CL_{50}$ ) de las medias de los valores de  $CL_{50}$  fueron calculados y registrados. Se consideró a la prueba válida si el coeficiente de variación (CV) (medida que determina la relación entre el tamaño de la media y la variabilidad de la  $CL_{50}$ ) fue menor al 25%, o si los intervalos de confianza de las  $CL_{50}$  se superpusieron (nivel de significación:  $p < 0.05$ ). Si la prueba fue válida, la  $CL_{50}$  a reportar fue la media obtenida a partir de las 5 repeticiones.

#### 4.4.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La comparación de  $CL_{50}$  entre tipos de extracto vegetal (extracto *S. mammosum* y extracto *A. arborescens*) se realizó utilizando una prueba de t.

Para comparar las  $CL_{50}$  entre extractos y AgNPs se utilizó un ANOVA I (Análisis de la Varianza de una vía) de la siguiente manera:

*S. mammosum*: Extracto vegetal acuoso, AgNPs sintetizadas a partir de extracto vegetal y AgNPs desnudas (control).

*A. arborescens*: Extracto vegetal acuoso, AgNPs sintetizadas a partir de extracto vegetal y AgNPs desnudas (control).

Para comparar las  $CL_{50}$  entre tipos de AgNPs (AgNPs sintetizadas a partir de extracto de *S. mammosum*, AgNPs sintetizadas a partir de extracto de *A. arborescens* y AgNPs control) se utilizó un ANOVA I.

Para determinar cuál es el mejor tratamiento, después de cada ANOVA se realizó una prueba de significación (Post Hoc) HSD Tukey. Esta prueba se realizó a niveles de significación de  $\alpha=0.05$  y  $\alpha=0.01$ .

Los análisis estadísticos anteriormente mencionados se realizaron con el software R (R Core Team, 2013); se utilizaron las funciones “t.test” (script en el anexo 3) para el t-test independiente y “aov” para las distintas comparaciones con ANOVA I (script en el anexo 4). Para la prueba de significación se utilizó el paquete “agricolae” (Mendiburu, 2016), función “HSD.test” (script en el anexo 4).

## 5. RESULTADOS

Los resultados de la actividad larvica del extracto acuoso y las AgNPs sintetizadas a partir de los extractos acuosos de *Solanum mammosum* y *Ambrosia arborescens* contra las larvas en L3 de *A. aegypti* se presentan en la tabla 1. La mortalidad fue evidente después del tratamiento tanto con extractos como con AgNPs de las dos especies vegetales. En todos los casos, el CV fue entre el 1 y 8 %, por lo que todas las pruebas realizadas fueron consideradas válidas.

### 5.1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD LARVICA DE LOS EXTRACTOS VEGETALES

Los resultados de los bioensayos utilizando extractos acuosos indican que la  $CL_{50}$  para *S. mammosum* fue de 1559.37 ppm (tabla 2), mientras que para *A. arborescens* fue de 1836.97 ppm (tabla 3). Al comparar la actividad larvica de los extractos vegetales de las dos plantas, se encontraron diferencias altamente significativas para la  $CL_{50}$  ( $t = 27.061$ ,  $p = 6.223e^{-10}$ ), siendo el extracto acuoso de *S. mammosum* el que presenta una mayor toxicidad contra *A. aegypti* (figura 4).

### 5.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD LARVICA DE LOS EXTRACTOS VEGETALES

En cuanto a los bioensayos utilizando AgNPs, los resultados muestran que la  $CL_{50}$  para aquellas sintetizadas con *S. mammosum* es de 0.06 ppm (tabla 4), mientras que para las sintetizadas a partir del extracto de *A. arborescens* la  $CL_{50}$  es de 0.28 ppm (tabla 5). Por otra parte, la  $CL_{50}$  para las AgNPs control fue de 266.95 ppm (tabla 6).

Al comparar la actividad larvica de los diferentes tipos de AgNPs, se encontraron diferencias altamente significativas en las  $CL_{50}$  ( $F = 7890$ ,  $p = 2e^{-16}$ ). Sin embargo, la prueba posthoc de HSD Tukey muestra que no existen diferencias entre las AgNPs de *S. mammosum* y *A. arborescens* al nivel de significación de 0.05 (figura 5). Evidentemente, las AgNPs sintetizadas a partir de los extractos de las dos plantas son bastante efectivas en



concentraciones muy bajas, mientras que las AgNPs control solamente son capaces de producir mortalidad en concentraciones entre 1 000 y 4 000 veces más altas.

### 5.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA DE *S. mammosum*

Al analizar los resultados obtenidos con cada una de las especies, podemos observar que las AgNPs de *S. mammosum* produjeron mortalidad en concentraciones al menos 25 000 veces más bajas que el extracto vegetal de la misma planta, y 1 000 veces más bajas que las AgNPs control, existiendo diferencias altamente significativas entre ellas ( $F= 716.3$ ,  $p= 3.29 \times 10^{-13}$ ) (figura 6). El mayor porcentaje de mortalidad para las AgNPs con esta planta fue de  $93.4 \pm 3.6 \%$ , el cual se obtuvo con 0.08 ppm (tabla 7), mientras que el máximo porcentaje de mortalidad para el extracto ( $97 \pm 2.1 \%$ ) se alcanzó con 6000 ppm (tabla 7).

### 5.4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA DE *A. arborescens*

En el caso de *A. arborescens*, la concentración letal media de las AgNPs fue aproximadamente 6 500 veces más baja que la del extracto vegetal y 4 000 veces más baja que la de las AgNPs control, existiendo diferencias altamente significativas entre ellas ( $F= 569.1$ ,  $p= 1.29 \times 10^{-12}$ ) (figura 7). El mayor porcentaje de mortalidad para las AgNPs con esta planta fue de  $96.4 \pm 1.8 \%$ , el cual se obtuvo con 0.5 ppm y para el extracto fue de  $92.8 \pm 1.3 \%$  con 6 000 ppm (tabla 7).

Finalmente, las AgNPs control produjeron mortalidad en concentraciones entre 5 y 7 veces más bajas que las de los extractos vegetales de ambas especies. En los grupos control de todos los experimentos realizados, no existió mortalidad durante el periodo de evaluación, por lo tanto, no fue necesario realizar correcciones en la mortalidad.

## 6. DISCUSIÓN

Los metabolitos secundarios de las plantas proveen de un importante repositorio de compuestos con un amplio rango de actividades biológicas. Estos metabolitos, que incluyen moléculas como alcaloides, glicoalcaloides, terpenoides, ácidos orgánicos y alcoholes, se producen en prácticamente todas las partes de la planta, y son una de las líneas de defensa más importantes para protegerse contra depredadores, en especial insectos (Adeyemi, 2010). El rango de efectos causados por estas sustancias es bastante amplio, e incluye la interrupción de vías metabólicas (Rietjens, Martena, Boersma, Spiegelenberg y Alink, 2005), disrupción de la integridad de macromoléculas (como proteínas y ácidos nucleicos) y organelas celulares (Mohanani y Devi, 1996; Keukens et al., 1995), alteraciones en el funcionamiento del sistema nervioso (Wink, 2000), y penetración a través del tubo respiratorio, produciendo mortalidad por sofocación y/o envenenamiento (Benelli, 2016).

### 6.1. EXTRACTOS VEGETALES DE SOLANÁCEAS UTILIZADOS COMO LARVICIDAS DE *A. aegypti* Y OTRAS ESPECIES DE MOSQUITOS DE IMPORTANCIA MÉDICA

Dentro del reino Plantae, uno de los taxa que se caracteriza por producir una gran variedad de metabolitos altamente tóxicos es la familia Solanaceae. Especies pertenecientes a esta familia son ricas en alcaloides, incluyendo tropano alcaloides, glicoalcaloides, pirrolizidin e indol alcaloides, los que se producen como un mecanismo de defensa natural contra insectos, predadores y agentes infecciosos (Jerzykiewicz, 2007). Esta familia contiene algunas de las especies más importantes a nivel económico, tales como la papa (*S. tuberosum*), tomate (*S. lycopersicum*) y tabaco (*Nicotiana tabacum*), así como también algunas especies muy conocidas por ser altamente tóxicas, como por ejemplo la belladona (*Atropa belladonna*), mandrágora (*Mandragora autumnalis*) y floripondio (*Brugmansia* sp.), entre otras.

Numerosas sustancias y extractos obtenidos a partir de solanáceas han sido evaluados para determinar si presentan actividad insecticida contra varias especies de insectos tanto de interés médico como económico. En numerosas ocasiones, se reporta este tipo de actividad

para compuestos como la  $\alpha$ -tomatina,  $\alpha$ -chaconina y  $\alpha$ -solanina, y para extractos provenientes de especies del género *Solanum* (Spring, Nagar, Ramteke y Ross, 2016).

Existen muy pocos reportes sobre la actividad larvica de extractos de solanáceas contra *A. aegypti*. Algunos autores han evaluado el efecto de extractos obtenidos a partir del fruto de estas plantas contra larvas L3 luego de 24 horas de exposición. Entre estos, Chowdhury, Laskar y Chandra (2008) evaluaron el extracto cloroformo: metanólico del fruto de *S. villosum* y determinaron una CL<sub>50</sub> de 11.67 ppm (intervalo de confianza (IC): 8.49-14.85). Raghavendra, Singh, Subbarao, y Dash (2009) evaluaron el extracto acuoso del fruto de *S. nigrum*, reportando una CL<sub>50</sub> de 359 ppm (IC: 244-496), mientras que el extracto metanólico del fruto de *S. xanthocarpum* alcanzó una CL<sub>50</sub> de 253.18 ppm (IC: 235.34–276.64) (Kumar et al., 2012). Otra estructura vegetal también preferida para evaluar su potencial larvica son las hojas; por ejemplo el extracto acetónico, clorofórmico y metanólico de las hojas de *S. trilobatum* contra larvas L4 produjeron valores de CL<sub>50</sub> de 125.67 ppm (IC: 115.68-135.17), 125.87 ppm (IC: 98.3-150.62) y 125.43 ppm (IC: 115.73-134.68) respectivamente (Premalatha, Elumalai y Jeyasankar, 2013). El extracto diclorometánico de las hojas de *Cestrum nocturnum* contra larvas L3 exhibe una CL<sub>50</sub> de 30.12 ppm (25.98-34.94) (Patil, Patil, Salunke, y Salunkhe, 2011).

La CL<sub>50</sub> del extracto vegetal acuoso del fruto de *S. mammosum* presentada en este estudio es mayor que la reportada para extractos similares preparados a partir de los frutos de otras especies de solanáceas. Esto podría estar ligado al tipo de solvente utilizado para realizar la extracción. Con la excepción del extracto acuoso del fruto de *S. nigrum*, todas las otras extracciones reportadas utilizaron compuestos orgánicos como solventes. Esto sugiere que las extracciones orgánicas producen soluciones con mayor toxicidad que las extracciones acuosas. Una potencial explicación para este fenómeno podría ser que algunos de los compuestos potencialmente tóxicos tienen baja solubilidad en agua, de tal manera que su concentración será menor en este tipo de disolvente. En el caso de los alcaloides, si estos se encuentran en forma de sales, son solubles en agua, pero si se están en forma de bases libres, son solubles en disolventes orgánicos no polares (Yúfera, 1995). Alternativamente, los solventes orgánicos podrían, por sí mismos, presentar un cierto nivel de toxicidad en las larvas de *A. aegypti*.

Si comparamos la CL<sub>50</sub> del extracto acuoso de *S. mammosum* reportada por nuestro estudio con aquella del extracto acuoso del fruto de *S. nigrum* reportado por Raghavendra et al. (2009) (1559.37 ppm y 359 ppm, respectivamente), es aparente que el extracto del fruto de *S. nigrum* presenta una toxicidad más elevada para las larvas L3 de *A. aegypti*. Sin embargo es importante tener en cuenta que la concentración de principios activos en los frutos puede depender de varios factores ambientales y fisiológicos asociados a la planta y su ambiente (tales como las condiciones de crianza de la planta, estado de madurez de la fruta, etc.) (Jerzykiewicz, 2007), por lo que sería necesario recoger más datos para poder realizar estudios comparativos con precisión.

## **6.2. EXTRACTOS VEGETALES DE ASTERÁCEAS UTILIZADOS COMO LARVICIDAS DE *A. aegypti* Y OTRAS ESPECIES DE MOSQUITOS DE IMPORTANCIA MÉDICA**

Dentro de la familia Asteraceae se encuentran representantes de gran interés para el hombre tanto para su alimentación como por sus aplicaciones medicinales, pues en esta familia encontramos especies como el girasol (*Helianthus annuus*), alcachofa (*Cynara scolymus*), lechuga (*Lactuca sativa*), manzanilla (*Chamaemelum nobile*) y cardo maría (*Sylibum marianum*). Sin embargo, también pertenecen a esta familia especies como el ajeno (*Artemisia absinthium*), eupatorio (*Eupatorium cannabinum*) y la petasita (*Petasites hybridus*), mismas que presentan una elevada toxicidad debido a la presencia de un amplio rango de agentes químicos de defensa contra los herbívoros, como por ejemplo lactonas sesquiterpénicas, monoterpenos, terpenoides y látex que contiene resinas poliacetilénicas (Mauseth, 2003).

El género *Ambrosia* posee una gran plasticidad fisiológica, misma que le permite adaptarse a prácticamente cualquier condición ambiental (Parkhomenko et al., 2006); dicha plasticidad puede explicarse, por lo menos en parte, por los metabolitos secundarios producidos por las especies de este género (Vera, 2008). Todas las especies de este género están caracterizadas por tener un alto contenido de lactonas sesquiterpénicas, las cuales poseen actividad antibacterial, citotóxica y antifúngica (Spring, Kupka, Maier y Hager, 1982; Neerman, 2003). Varios estudios reportan el aislamiento de las principales lactonas

sesquiterpénicas a partir de *A. arborecens*: damsina, coronofilina psilostaquinas (Herz, Anderson, Gibaja y Raulais, 1969; Vera, 2008; De Leo, Vera, Naranjo, De Tommasi y Braca, 2010).

Existen numerosos estudios sobre la actividad larvicida de extractos de asteráceas contra *A. aegypti*, varios de ellos empleando toda la planta; por ejemplo, el extracto metanólico de *Eclipta alba* contra larvas L3 obtuvo una CL<sub>50</sub> del 127.64 ppm (IC: 94.72-160.29) (Govindarajan y Karupppannan, 2011); la CL<sub>50</sub> obtenida a partir del extracto etéreo de *Heli oppositifolia* es de 41 ppm (IC: 38-49) mientras que el extracto de *Jaegeria hirta* obtuvo una CL<sub>50</sub> de 24 ppm (IC: 22-29) (Álvarez, Duarte, Aguirre y Jiménez, 2013). En cuanto a extractos obtenidos a partir de las hojas, la extracción metanólica de *Chromolaena odorata* produjo una CL<sub>50</sub> de 138 ppm (IC: 121-157) (Sukththankar, Kumar, Godinho y Kumar, 2014); mientras que las extracciones de *Ageratum houstonianum* utilizando hexano y etil-acetato produjeron concentraciones letales medias de 8889.13 ppm y 1952.12 ppm respectivamente (Tennyson, Ravindran, Eapen y William, 2015).

Dentro del género *Ambrosia*, existe apenas un reporte de actividad larvicida contra *A. aegypti* aparte del presente estudio, en el cual se emplea el extracto etéreo de las partes aéreas de *Ambrosia confertifolia*, dando como resultado una CL<sub>50</sub> de 185.6 ppm (IC: 152.3-207.4) (De La Torre, Martínez, Flores, De Torres y Salazar, 2013). Evidentemente, la concentración letal media del extracto de *A. confertifolia* es menor en comparación al de *A. arborecens*, sin embargo es necesario nuevamente tomar en cuenta la mayor eficiencia de extracción con compuestos orgánicos en comparación con la extracción acuosa. Aunque no existen estudios comparables que utilicen extractos acuosos dentro de este género como larvicidas de *A. aegypti*, existe un reporte de la actividad del extracto acuoso obtenido a partir de las hojas de *Ambrosia marítima* contra larvas de *Culex* colectadas en el campo, en el cual la CL<sub>50</sub> obtenida fue de 1349 ppm (Eisa, 2010), es decir, 1.36 veces menor a la de *A. arborecens* obtenida en el presente trabajo.

Los resultados obtenidos con la extracción acuosa de *S. mammosum* y *A. arborecens* demuestran que ambas plantas poseen compuestos químicos con actividad larvicida. El tipo de solvente escogido para realizar la extracción fue el agua y si bien produce mortalidad en concentraciones entre 1 y 100 veces más altas en comparación con la extracción orgánica, es una alternativa sustancialmente más económica, simple y amigable con el ambiente.

A pesar de que se considera que la acción biológica de los diferentes metabolitos secundarios es la principal razón que explica la eficacia de los extractos botánicos para matar a las larvas, se considera también que la formación de una delgada capa oleosa sobre la superficie del agua producto de los diferentes compuestos extraídos puede reducir el suministro de oxígeno para la larva del mosquito, pudiendo producir sofocación (Benelli, 2016).

### **6.3. AgNPs DE SOLANÁCEAS UTILIZADAS COMO LARVICIDAS DE *A. aegypti* Y OTRAS ESPECIES DE MOSQUITOS DE IMPORTANCIA MÉDICA**

Una gran cantidad de AgNPs sintetizadas a partir de extractos vegetales han sido probadas para determinar su potencial bactericida, antifúngico, citotóxico, anticancerígeno, antiviral, antidiabético, antiparasitario y acaricida, entre otros (Rajan, Chandran, Harper, Yun, & Kalaichelvan, 2015). Dentro de la rama de interés de este estudio, existen varios reportes de AgNPs utilizadas como ovicidas, larvicidas, pupicidas y adulticidas contra especies de mosquito de importancia médica y/o veterinaria (Marimuthu et al., 2011; Raman, Sudharsan, Veerakumar, Pravin, & Vithiya, 2012; Dinesh et al., 2015; Ramanibai & Velayutham, 2015). En la mayoría de casos, las concentraciones letales medias de estas AgNPs son extremadamente bajas, fluctuando entre 1 y 30 ppm. Por ejemplo, las AgNPs fabricadas utilizando el extracto vegetal de la semilla de *Sterculia foetida* (Malvaceae) produjeron valores de CL<sub>50</sub> menores de 4.5 ppm contra las larvas de *A. stephensi*, *C. quinquefasciatus* y *A. aegypti* (Rajasekharreddy & Rani, 2014).

Al igual que con los extractos vegetales, no existen muchos estudios sobre la actividad larvicida de AgNPs sintetizadas a partir de solanáceas. En 2013, Rawani, Ghosh, & Chandra emplearon el extracto acuoso del fruto de *S. nigrum* para sintetizar AgNPs y probaron su toxicidad contra las larvas L3 de *C. quinquefasciatus* y *A. stephensi*, obteniendo como resultado una CL<sub>50</sub> de 2.44 y 1.54 ppm respectivamente. Por otra parte, las AgNPs obtenidas a partir del extracto foliar de *Datura metel* alcanzaron una CL<sub>50</sub> de 4.288 ppm (IC: 3.630-4.840) contra las larvas de *A. stephensi* (Murugan, Dinesh, Kumar, et al., 2015).

Hasta donde tenemos conocimiento, existe un único estudio anterior que explora el uso de AgNPs contra larvas de *A. aegypti*. En él, AgNPs sintetizadas a partir de las hojas de *Nicandra physaloides* mostraron una CL<sub>50</sub> de 13.61 ppm (IC: 12.26-14.83) (Govindarajan, Khater, Panneerselvam y Benelli, 2016). La concentración letal media de las AgNPs obtenidas a partir de *S. mammosum* contra *A. aegypti* es, por lo tanto, la más baja reportada para la familia Solanaceae, siendo entre 25 y 200 veces menor en comparación a los estudios anteriormente señalados.

#### **6.4. AgNPs DE ASTERÁCEAS UTILIZADAS COMO LARVICIDAS DE *A. aegypti* Y OTRAS ESPECIES DE MOSQUITOS DE IMPORTANCIA MÉDICA**

Los reportes del uso de AgNPs sintetizadas a partir de asteráceas como larvicidas también son escasos. En múltiples casos, se prueban tanto el extracto vegetal como las AgNPs sintetizadas a partir del mismo; tal es el caso de *Eclipta prostrata*, cuyo extracto y AgNPs probados contra las larvas L4 de *C. quinquefasciatus* obtuvieron CL<sub>50</sub> de 27.49 ppm (IC: 24.36-31.03) y 4.56 ppm (IC: 4.16-5.80) respectivamente (Rajakumar y Rahuman, 2011).

Un solo estudio, aparte del presente, evalúa la actividad larvicida contra *A. aegypti*; en este, el extracto (en este caso, etanólico) vegetal de las hojas de *Artemisia vulgaris* y las AgNPs obtenidas a partir de este extracto producen una CL<sub>50</sub> de 288.252 ppm (IC: 262.988-312.967) y 8.273 ppm (IC: 6.705-10.021) respectivamente (Nalini, Lena, Sumathi y Sundaravadivelan, 2017). Estas concentraciones letales son al menos 15 veces mayores en comparación con las obtenidas utilizando las AgNPs sintetizadas a partir del extracto de *A. arborescens*, por lo tanto estas últimas son también las más efectivas dentro de su respectiva familia (Asteraceae).

## **6.5. CONSIDERACIONES EN CUANTO A LA APLICABILIDAD DE NANOPARTÍCULAS PARA CONTROL DE VECTORES**

El uso de distintos extractos y compuestos botánicos como agentes reductores y estabilizadores se ha probado como un método eficiente para producir nanopartículas metálicas de diferente tamaño y forma. Más importante aún, se ha encontrado que este proceso aporta al desarrollo de propiedades tóxicas contra las larvas de mosquitos (Benelli, 2016). Este fenómeno se puede observar también en el presente estudio, ya que las AgNPs desnudas no son tan efectivas como aquellas que son sintetizadas a partir de un extracto vegetal larvicida.

Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de publicaciones sobre la aplicación de nanopartículas sintetizadas a partir de extractos vegetales en el control poblacional de mosquitos vectores, existe un gran vacío entre la teoría y la aplicación práctica de esos conceptos, ya que muy poco esfuerzo se ha empleado en explicar el mecanismo de toxicidad que produce la mortalidad en las larvas expuestas a este tipo de nanopartículas (Murugan et al., 2016).

Una de las pocas hipótesis sugiere que la toxicidad en larvas está relacionada a la habilidad de las nanopartículas para penetrar a través del exoesqueleto y dentro de las células, donde interfieren con procesos fisiológicos como la muda (Arjunan, Murugan, Rejeeth, Madhiyazhagan, & Barnard, 2012). Otras hipótesis sugieren que dentro del espacio intracelular, las nanopartículas se unen al azufre de las proteínas o al fósforo del DNA, produciendo una rápida denaturación de moléculas y organelas. Este fenómeno es capaz de aumentar la permeabilidad de la membrana (tanto celular como mitocondrial) y alterar la fuerza protón-motriz, produciendo una pérdida de las funciones celulares y potencialmente, la muerte celular (Subramaniam et al., 2015).

A pesar de este vacío en el conocimiento sobre las nanopartículas, existe evidencia la cual sugiere que la toxicidad de las AgNPs sintetizadas utilizando extractos vegetales no se extiende a otras especies que pueden compartir el ambiente de las especies-objetivo. Por ejemplo, Rawani y colaboradores (2013) demostraron que las AgNPs sintetizadas utilizando el extracto del fruto de *S. nigrum* no eran tóxicas contra larvas de tres especies del género



*Toxorhynchites* (especie de culícido cuyas larvas se alimentan de, y compiten con otras larvas de mosquito), *Diplonychus annulatum* (especie de hemíptero de la familia Belostomatidae conocido como “chinche de agua”) y las larvas de *Chironomus circumdatus* (especie de díptero de la familia Chironomidae), ya que al exponer a estas especies a las concentraciones letales medias encontradas para *A. stephensi* y *C. quinquefasciatus*, no se evidenció mortalidad ni alteraciones físicas.

De la misma manera, Haldar, Haldar, & Chandra (2013) no detectaron toxicidad utilizando AgNPs sintetizadas a partir del fruto de *Drypetes roxburghii* (Putranjivaceae) sobre individuos de *Poecilia reticulata* (especie de pez depredadora de larvas de mosquito) luego de ser expuestos durante 48 horas a la CL<sub>50</sub> (de AgNPs) necesaria para matar larvas L4 de *A. stephensi* y *C. quinquefasciatus*.

En algunos casos, se ha encontrado que dosis subletales de AgNPs son capaces de reducir la motilidad de larvas de mosquito, facilitando así que estas se vuelvan presa de sus enemigos naturales (Benelli, 2016). Por ejemplo, la aplicación de AgNPs sintetizadas a partir de *Bruguiera cylindrica* (Rhizophoraceae) en una dosis subletal para larvas L3 de *A. aegypti* aumenta la eficiencia de depredación del pez dorado *Carassius auratus* de un 50.43 % (en ausencia de AgNPs), a un 76.81 % en un ambiente tratado con AgNPs (Murugan et al., 2015).

Finalmente, es importante reconocer que falta mucho por explorar y definir dentro de esta área de investigación, sobre todo en cuanto a los mecanismos de acción de las nanopartículas ya que ninguna de las hipótesis ha sido probada hasta el momento. Asimismo, es vital evaluar la utilidad de las nanopartículas contra las larvas de culícidos en condiciones de campo, y los efectos colaterales y residualidad en el ambiente de las mismas. Esto permitirá determinar las ventajas, desventajas y potenciales riesgos de aplicar nanopartículas a gran escala, ya que el objetivo de su creación es poder incluirlas como una alternativa dentro de los programas de manejo de vectores a nivel nacional, regional, continental, etc. En cuanto al uso de nanopartículas para el control de otros artrópodos de importancia médica, no existen estudios al respecto hasta donde tenemos conocimiento, sin embargo se considera que es necesario primeramente conocer cuál es el mecanismo de acción de este potencial larvicida, su modo de ingreso o penetración al organismo y los tejidos blanco, para determinar el tipo de aplicación correspondiente a cada especie.

## 7. CONCLUSIONES

Los extractos vegetales acuosos de *S. mammosum* y *A. arborescens* poseen actividad larvica contra *A. aegypti*, siendo más efectivo el extracto de *S. mammosum* ya que presenta una menor concentración letal media.

Las AgNPs sintetizadas a partir de extractos vegetales acuosos de *S. mammosum* y *A. arborescens* poseen actividad larvica contra *A. aegypti*, siendo las AgNPs sintetizadas a partir del extracto de *S. mammosum* las más efectivas ya que presentan una menor concentración letal media.

El potencial larvica de las AgNPs sintetizadas con los extractos vegetales acuosos de las dos especies es mucho mayor al de los extractos vegetales. Sin embargo, las AgNPs desnudas no son tan efectivas como las combinadas con los extractos de las plantas. Estos resultados apoyan a la hipótesis de que la presencia de componentes vegetales en las nanopartículas aporta significativamente en el desarrollo de propiedades tóxicas.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbott, W. (1987). A Method of Computing The Effectiveness of an Insecticide. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 3(2), 302–303. doi: 10.1093/jee/18.2.265a.
2. Adeyemi, M. (2010). The potential of secondary metabolites in plant material as deterrents against insect pests: A review. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 4(11), 243–246. Recuperado de [http://www.academicjournals.org/article/article1379502578\\_Adeyemi.pdf](http://www.academicjournals.org/article/article1379502578_Adeyemi.pdf).
3. Aguirre, A. (2016). *Determinación de la sensibilidad al insectidas deltametrina e identificación de alelos de resistencia a piretroides en poblaciones ecuatorianas de Aedes aegypti* (Disertación de Pregrado). Escuela Politécnica del Ejército, Quito, Ecuador.
4. Álvarez-Londoño, J., Duarte-Gandica, I., Aguirre-Obando, O. y Jiménez-Montoya, J. (2013). Control del vector del dengue utilizando fracciones etéreas de dos plantas (Asteraceae) como larvicidas. *Revista de Salud Pública*, 15(2), 227–236. Recuperado de <http://revistas.unal.edu.co/index.php/revsaludpublica/article/view/27980>.
5. Arjunan, N., Murugan, K., Rejeeth, C., Madhiyazhagan, P. y Barnard, D. (2012). Green synthesis of silver nanoparticles for the control of mosquito vectors of malaria, filariasis, and dengue. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, 12(3), 262–268. doi: 10.1089/vbz.2011.0661.
6. Arthur, B., Emr, K., Wytenbach, R., y Hoy, R. (2014). Mosquito (*Aedes aegypti*) flight tones: frequency, harmonicity, spherical spreading, and phase relationships. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 135(2), 933–41. doi: 10.1121/1.4861233.
7. Benelli, G. (2016). Plant-mediated biosynthesis of nanoparticles as an emerging tool against mosquitoes of medical and veterinary importance: a review. *Parasitology Research*, 115(1), 23–34. doi: 10.1007/s00436-015-4800-9.
8. Benelli, G., Caselli, A. y Canale, A. (2016). Nanoparticles for mosquito control: Challenges and constraints. *Journal of King Saud University - Science*. doi: 10.1016/j.jksus.2016.08.006.
9. Bisset, J., Rodríguez, M. y Fernández, D. (2006). Selection of insensitive acetylcholinesterase as a resistance mechanism in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Santiago de Cuba. *Journal of Medical Entomology*, 43(6), 1185–1189. doi: 10.1093/jmedent/43.6.1185.
10. Borase, H., Patil, C., Patil, R., Salunkhe, R., Narkhede, C., Salunke, B. y Patil, S. (2013). Phyto-Synthesized Silver Nanoparticles: A Potent Mosquito Biolarvicidal Agent. *Journal of Nanomedicine & Biotherapeutic Discovery*, 3(1). doi: 10.4172/2155-983X.1000111.

11. Carvalho, D., Nimmo, D., Naish, N., McKerney, A., Gray, P., Wilke, A., ... Capurro, M. (2014). Mass production of genetically modified *Aedes aegypti* for field releases in Brazil. *Journal of Visualized Experiments*, 83(e3579), 1–10. doi: 10.3791/3579.
12. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2012). Mosquito Life-Cycle. Recuperado de [https://www.cdc.gov/dengue/entomologyecology/m\\_lifecycle.html](https://www.cdc.gov/dengue/entomologyecology/m_lifecycle.html).
13. Chamberlain, R. y Sudia, W. (1961). Mechanism of Transmission of Viruses by Mosquitoes. *Annual Review of Entomology*, 6(1), 371–390. doi: 10.1146/annurev.en.06.010161.002103.
14. Cook, G. y Zumla, A. (2008). *Manson's Tropical Diseases*. Philadelphia: Saunders.
15. da Silva, J. y Mendes, J. (2007). Susceptibility of *Aedes aegypti* (L) to the insect growth regulators diflubenzuron and methoprene in Uberlândia, State of Minas Gerais. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40(6), 612–616. Recuperado de <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v40n6/a02v40n6.pdf>.
16. De La Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M., & Balslev, H. (2008). *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador*. Quito: Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de las Pontificia Universidad Católica del Ecuador & Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus.
17. De La Torre, Y., Martínez, F., Flores, A., De Torres, N. y Salazar, R. (2013). Larvicidal and Cytotoxic Activities of Extracts From 11 Native Plants From Northeastern Mexico. *Journal of Medical Entomology*, 50(2), 310–313. doi: doi.org/10.1603/ME12056.
18. De Leo, M., Vera, M., Naranjo, B., De Tommasi, N. y Braca, A. (2010). Sesquiterpenes and diterpenes from *Ambrosia arborescens*. *Phytochemistry*, 71(7), 804–809. doi: 10.1016/j.phytochem.2010.02.002.
19. Dinesh, D., Murugan, K., Madhiyazhagan, P., Panneerselvam, C., Mahesh Kumar, P., Nicoletti, M., ... Suresh, U. (2015). Mosquitocidal and antibacterial activity of green-synthesized silver nanoparticles from *Aloe vera* extracts: towards an effective tool against the malaria vector *Anopheles stephensi*? *Parasitology Research*, 114(4), 1519–1529. doi: 10.1007/s00436-015-4336-z.
20. Domenech, F. (2017). *Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata usando extracto de hojas de Ambrosia arborescens (marco) como reductor químico* (Disertación de pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
21. Eisa, A. (2010). Toxicity of *Ambrosia maritima* L. leaves aqueous extract and abate aqueous solutions, on *Culex* species (Tesis de Maestría). University of Khartoum, Kharthoum State, Sudán.
22. Enviromental Protection Agency (EPA). (2011). Product Cancellation Order for Certain Pesticide Registrations. *Federal Register*, 76(38), 10587–10591. Recuperado de <https://www.federalregister.gov/documents/2017/03/23/2017-05700/product-cancellation-order-for-certain-pesticide-registrations-and-amendments-to-terminate>.

23. Finney, D. (1971). *Probit Analysis*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
24. Ghosh, A., Chowdhury, N. y Chandra, G. (2012). Plant extracts as potential mosquito larvicides. *Indian Journal of Medical Research*, 135(5), 581–598. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3401688/?report=reader>.
25. Govindarajan, M., Jebanesan, A. y Reetha, D. (2005). Larvicidal effect of extracellular secondary metabolites of different fungi against the mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say. *Tropical Biomedicine*, 22(1), 1–3. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/articles/16880747/>.
26. Govindarajan, M. y Karupppannan, P. (2011). Mosquito larvicidal and ovicidal properties of *Eclipta alba* (L.) Hassk (Asteraceae) against chikungunya vector, *Aedes aegypti* (Linn.) (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 24–28. doi: 10.1016/S1995-7645(11)60026-6.
27. Govindarajan, M., Khater, H., Panneerselvam, C. y Benelli, G. (2016). One-pot fabrication of silver nanocrystals using *Nicandra physalodes*: A novel route for mosquito vector control with moderate toxicity on non-target water bugs. *Research in Veterinary Science*, 107, 95–101. doi: 10.1016/j.rvsc.2016.05.017.
28. Halder, K. M., Halder, B. y Chandra, G. (2013). Fabrication, characterization and mosquito larvicidal bioassay of silver nanoparticles synthesized from aqueous fruit extract of putranjiva, *Drypetes roxburghii* (Wall.). *Parasitology Research*, 112(4), 1451–1459. doi: 10.1007/s00436-013-3288-4.
29. Herz, W., Anderson, G., Gibaja, S. y Raulais, D. (1969). Sesquiterpene lactones of some *Ambrosia* species. *Phytochemistry*, 8(5), 877–881. doi: 10.1016/S0031-9422(00)85877-X.
30. Hurst, T., Kay, B., Ryan, P. y Brown, M. (2007). Sublethal Effects of Mosquito Larvicides on Swimming Performance of Larvivorous Fish *Melanotaenia duboulayi*: (Atheriniformes: Melanotaeniidae). *Journal of Economic Entomology*, 100(1), 61–65. doi: 10.1603/0022-0493(2007)100[61:SEOMLO]2.0.CO;2.
31. Institute of Medicine (IOM). (2008). *Forum on Microbial Threats: Vector-Borne Diseases: Understanding the Environmental, Human Health, and Ecological Connections (Workshop Summary)*. Washington: National Academies Press (US).
32. Jayaseelan, C., Rahuman, A., Rajakumar, G., Kirthi, A., Santhoshkumar, T., Marimuthu, S., ... Elango, G. (2011). Synthesis of pediculocidal and larvicidal silver nanoparticles by leaf extract from heartleaf moonseed plant, *Tinospora cordifolia* Miers. *Parasitology Research*, 109(1), 185–194. doi: 10.1007/s00436-010-2242-y.
33. Jerzykiewicz, J. (2007). Alkaloids of Solanaceae (nightshade plants). *Postepy Biochemstry*, 53(3), 280–6. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18399356>

34. Jørgensen, P. y León-Yáñez, S. (Eds.). (1999). Catalogue of the vascular plants of Ecuador. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*, 75(i–vii), 1–1182. Recuperado de <http://www.tropicos.org/Name/29600119>.
35. Kameswara, S., Giri, D., Pal, D., Mishra, P. y Upadhyay, S. (2016). Green Synthesis of Silver Nanoparticles: A Review. *Green and Sustainable Chemistry*, 6(6), 34–56. doi: 10.4236/gsc.2016.61004.
36. Keukens, E., de Vrije, T., van den Boom, C., de Waard, P., Plasman, H., Thiel, F., ... de Kruijff, B. (1995). Molecular basis of glycoalkaloid induced membrane disruption. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1240(2), 216–228. doi: 10.1016/0005-2736(95)00186-7.
37. Kumar, P., Murugan, K., Kovendan, K., Panneerselvam, C., Kumar, K., Amerasan, D., ... Nataraj, T. (2012). Mosquitocidal activity of *Solanum xanthocarpum* fruit extract and copepod *Mesocyclops thermocyclopoides* for the control of dengue vector *Aedes aegypti*. *Parasitology Research*, 111(2), 609–618. doi: 10.1007/s00436-012-2876-z.
38. Marimuthu, S., Rahuman, A., Rajakumar, G., Santhoshkumar, T., Kirthi, A., Jayaseelan, C., ... Kamaraj, C. (2011). Evaluation of green synthesized silver nanoparticles against parasites. *Parasitology Research*, 108(6), 1541–1549. doi: 10.1007/s00436-010-2212-4.
39. Mauseth, J. (2003). *Botany: An Introduction to Plant Biology*. Burlington: Jones and Bartlett Publishers. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=0DfYJsVRmUcC>
40. Mendiburu, F. (2016). *Statistical Procedures for Agricultural Research*. Lima: Universidad Nacional de Ingeniería del Perú. Recuperado de <https://cran.r-project.org/web/packages/agricolae/agricolae.pdf>.
41. Miller, R. (1969). A Morphological Study of *Solanum mammosum* and Its Mammiform Fruit. *Botanical Gazette*, 130(4), 230–237. doi: 10.1086/336496.
42. Mohanan, P. y Devi, K. (1996). Cytotoxic potential of the preparations from *Solanum trilobatum* and the effect of sobatum on tumour reduction in mice. *Cancer Letters*, 110(1–2), 71–76. doi: 10.1016/S0304-3835(96)04463-1.
43. Ministerio de Salud Pública del Ecuador (MSP). (2013). Boletín epidemiológico No. 39 de la situación de Dengue en el Ecuador 2013. Recuperado de <http://www.salud.gob.ec/boletin-epidemiologico-no-39-de-la-situacion-de-dengue-en-el-ecuador-2013/>
44. Murugan, K., Dinesh, D., Kumar, P. J., Panneerselvam, C., Subramaniam, J., Madhiyazhagan, P., ... Benelli, G. (2015). *Datura metel*-synthesized silver nanoparticles magnify predation of dragonfly nymphs against the malaria vector *Anopheles stephensi*. *Parasitology Research*, 114(12), 4645–4654. doi: 10.1007/s00436-015-4710-x.

45. Murugan, K., Dinesh, D., Paulpandi, M., Althbyani, A., Subramaniam, J., Madhiyazhagan, P., ... Benelli, G. (2015). Nanoparticles in the fight against mosquito-borne diseases: bioactivity of *Bruguiera cylindrica*-synthesized nanoparticles against dengue virus DEN-2 (in vitro) and its mosquito vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 114(12), 4349–4361. doi: 10.1007/s00436-015-4676-8.
46. Murugan, K., Nataraj, D., Madhiyazhagan, P., Sujitha, V., Chandramohan, B., Panneerselvam, C., ... Benelli, G. (2016). Carbon and silver nanoparticles in the fight against the filariasis vector *Culex quinquefasciatus*: genotoxicity and impact on behavioral traits of non-target aquatic organisms. *Parasitology Research*, 115(3), 1071–1083. doi: 10.1007/s00436-015-4837-9.
47. Muthukumar, U., Govindarajan, M., Rajeswary, M. y Hoti, S. L. (2015). Synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Gmelina asiatica* leaf extract against filariasis, dengue, and malaria vector mosquitoes. *Parasitology Research*. doi: 10.1007/s00436-015-4368-4.
48. Nalini, M., Lena, M., Sumathi, P. y Sundaravadivelan, C. (2017). Effect of phyto-synthesized silver nanoparticles on developmental stages of malaria vector, *Anopheles stephensi* and dengue vector, *Aedes aegypti*. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*. doi: 10.1016/j.ejbas.2017.04.005.
49. Neerman, M. (2003). Sesquiterpene lactones: a diverse class of compounds found in essential oils possessing antibacterial and antifungal properties. *International Journal of Aromatherapy*, 13(2–3), 114–120. doi: 10.1016/S0962-4562(03)00078-X.
50. Organización Mundial de la Salud (OMS). (2016). Dengue y dengue grave. Recuperado de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>.
51. Parkhomenko, A., Oganessian, E., Andreeva, O., Dorkina, E., Paukova, E. y Agadzhanyan, Z. (2006). Pharmacologically active substances from *Ambrosia artemisiifolia*: Part 2. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 40(11), 627–632. doi: 10.1007/s11094-006-0208-2.
52. Patil, C., Patil, S., Salunke, B. y Salunkhe, R. (2011). Bioefficacy of *Plumbago zeylanica* (Plumbaginaceae) and *Cestrum nocturnum* (Solanaceae) plant extracts against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and nontarget fish *Poecilia reticulata*. *Parasitology Research*, 108(5), 1253–1263. doi: 10.1007/s00436-010-2174-6
53. Poopathi, S. y Abidha, S. (2010). Mosquitocidal bacterial toxins (*Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis): Mode of action, cytopathological effects and mechanism of resistance. *Journal of Physiology and Pathophysiology*, 1(3), 22–38. Recuperado de <http://www.academicjournals.org/ijmms>.
54. Premalatha, S., Elumalai, K. y Jeyasankar, A. (2013). Mosquitocidal properties of *Solanum trilobatum* L. (Solanaceae) leaf extracts against three important human vector mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6(11), 854–858. doi: 10.1016/S1995-7645(13)60152-2.

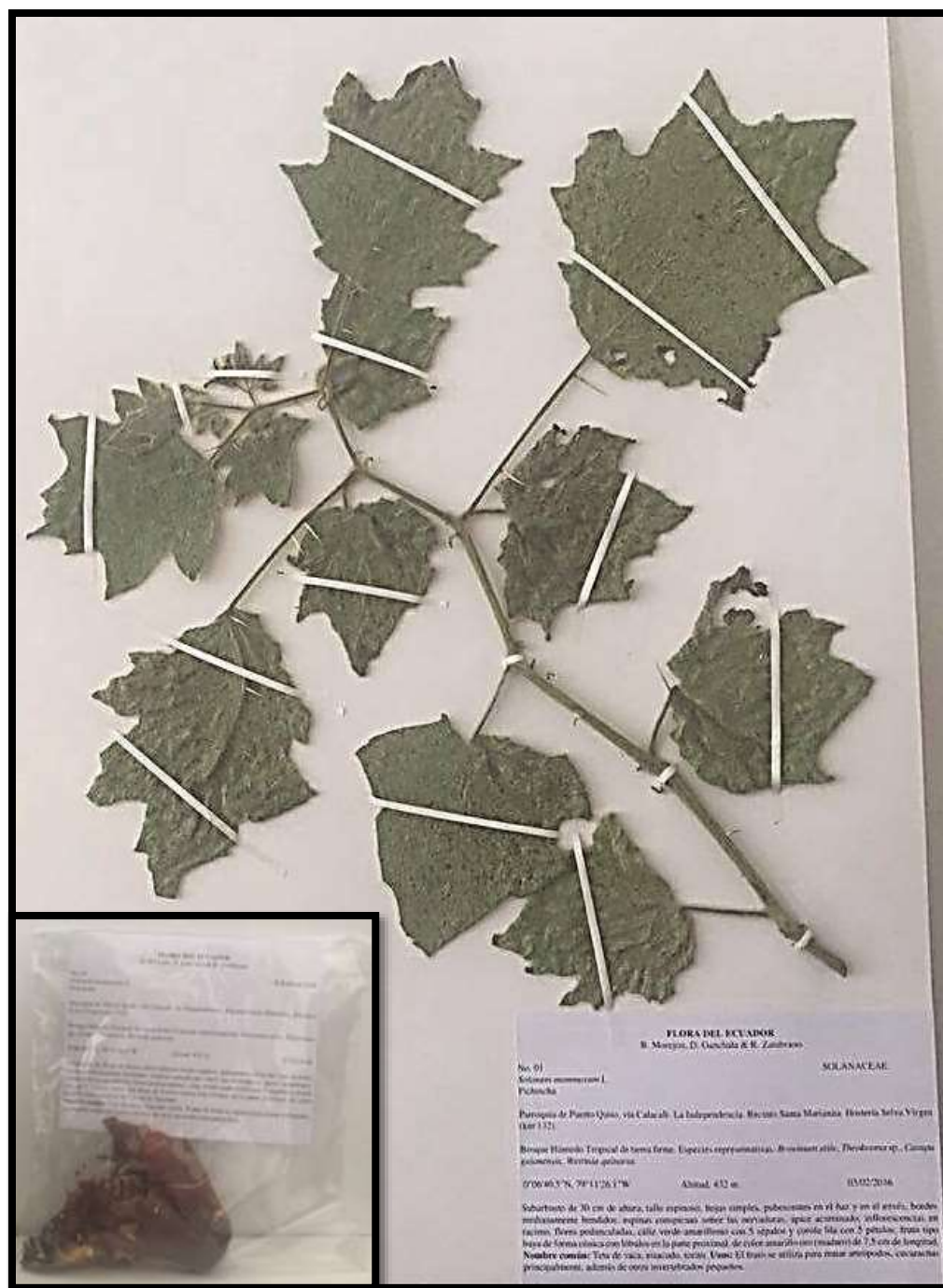
55. Priyadarshini, A., Murugan, K., Panneerselvam, C., Ponarulselvam, S., Hwang, J. y Nicoletti, M. (2012). Biolarvicidal and pupicidal potential of silver nanoparticles synthesized using *Euphorbia hirta* against *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 111(3), 997–1006. doi: 10.1007/s00436-012-2924-8.
56. R Core Team. (2013). R: A language and environment for statistical computing. Viena: Foundation for Statistical Computing. Recuperado de <http://www.r-project.org/>
57. Raghavendra, K., Singh, S., Subbarao, S. y Dash, A. (2009). Laboratory studies on mosquito larvicidal efficacy of aqueous & hexane extracts of dried fruit of *Solanum nigrum* Linn. *Indian Journal of Medical Research*, 130(1), 74–77. Recuperado de [https://www.researchgate.net/publication/26761146\\_Laboratory\\_studies\\_on\\_mosquito\\_larvicidal\\_efficacy\\_of\\_aqueous\\_hexane\\_extract\\_of\\_dried\\_fruit\\_of\\_Solanum\\_nigrum](https://www.researchgate.net/publication/26761146_Laboratory_studies_on_mosquito_larvicidal_efficacy_of_aqueous_hexane_extract_of_dried_fruit_of_Solanum_nigrum).
58. Rajakumar, G. y Rahuman, A. (2011). Larvicidal activity of synthesized silver nanoparticles using *Eclipta prostrata* leaf extract against filariasis and malaria vectors. *Acta Tropica*, 118(3), 196–203. doi: 10.1016/j.actatropica.2011.03.003.
59. Rajan, R., Chandran, K., Harper, S., Yun, S.; y Kalaichelvan, P. (2015). Plant extract synthesized silver nanoparticles: An ongoing source of novel biocompatible materials. *Industrial Crops and Products*, 70, 356–373. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.03.015.
60. Rajasekharreddy, P. y Rani, P. (2014). Biofabrication of Ag nanoparticles using *Sterculia foetida* L. seed extract and their toxic potential against mosquito vectors and HeLa cancer cells. *Materials Science and Engineering: C*, 39, 203–212. doi: 10.1016/j.msec.2014.03.003.
61. Raman, N., Sudharsan, S., Veerakumar, V., Pravin, N. y Vithiya, K. (2012). *Pithecellobium dulce* mediated extra-cellular green synthesis of larvicidal silver nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 96, 1031–1037. doi: 10.1016/j.saa.2012.08.011.
62. Ramanibai, R. y Velayutham, K. (2015). Bioactive compound synthesis of Ag nanoparticles from leaves of *Melia azedarach* and its control for mosquito larvae. *Research in Veterinary Science*, 98, 82–88. doi: 10.1016/j.rvsc.2014.11.009
63. Rawani, A., Ghosh, A. y Chandra, G. (2013). Mosquito larvicidal and antimicrobial activity of synthesized nano-crystalline silver particles using leaves and green berry extract of *Solanum nigrum* L. (Solanaceae: Solanales). *Acta Tropica*, 128(3), 613–622. doi: 10.1016/j.actatropica.2013.09.007.
64. Rietjens, I., Martena, M., Boersma, M., Spiegelberg, W. y Alink, G. (2005). Molecular mechanisms of toxicity of important food-borne phytotoxins. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(2), 131–158. doi: 10.1002/mnfr.200400078.
65. Ruales, C. (2013). *Plantas de Quito-La vegetación original de una ciudad siempre verde*. Quito: Universidad San Francisco de Quito.



66. Santhoshkumar, T., Rahuman, A., Rajakumar, G., Marimuthu, S., Bagavan, A., Jayaseelan, C., ... Kamaraj, C. (2011). Synthesis of silver nanoparticles using *Nelumbo nucifera* leaf extract and its larvicidal activity against malaria and filariasis vectors. *Parasitology Research*, 108(3), 693–702. doi: 10.1007/s00436-010-2115-4.
67. Sardar, T., Rana, S. y Chattopadhyay, J. (2015). A mathematical model of dengue transmission with memory. *Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation*, 22(1), 511–525. doi: 10.1016/j.cnsns.2014.08.009.
68. Spring, O., Kupka, J., Maier, B. y Hager, A. (1982). Biological Activities of Sesquiterpene Lactones from *Helianthus annuus*: Antimicrobial and Cytotoxic Properties; Influence on DNA, RNA, and Protein Synthesis. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 37(11–12), 1087–1091. doi: 10.1515/ZNC-1982-11-1207.
69. Spring, P., Nagar, S., Ramteke, P. y Ross, E. (2016). Biological Activities of Solanaceous Plants Against Vector Mosquitoes: A Review, 1(4). Recuperado de <http://www.conferenceinfo.org/admin/resources/project/paper/f201609221474602567.pdf>.
70. Subramaniam, J., Murugan, K., Panneerselvam, C., Kovendan, K., Madhiyazhagan, P., Kumar, P. M., ... Benelli, G. (2015). Eco-friendly control of malaria and arbovirus vectors using the mosquitofish *Gambusia affinis* and ultra-low dosages of *Mimusops elengi*-synthesized silver nanoparticles: towards an integrative approach? *Environmental Science and Pollution Research*, 22(24), 20067–20083. doi: 10.1007/s11356-015-5253-5.
71. Sukhthankar, J., Kumar, H., Godinho, M. y Kumar, A. (2014). Larvicidal activity of methanolic leaf extracts of plant, *Chromolaena odorata* L. (Asteraceae) against vector mosquitoes. *International Journal of Mosquito Research*, 33(13), 33–38. Recuperado de <http://www.dipterajournal.com/vol1issue3/august2014/16.1.pdf>.
72. Tennyson, S., Ravindran, J., Eapen, A. y William, J. (2015). Larvicidal activity of *Ageratum houstonianum* Mill. (Asteraceae) leaf extracts against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5, S73–S76. doi: 10.1016/S2222-1808(15)60860-X.
73. Thiagarajan, P., Kumar, P., Kovendan, K. y Murugan, K. (2014). Effect of medicinal plant and microbial insecticides for the sustainable mosquito vector control. *Acta Biologica Indica*, 3(1), 527–535. Recuperado de <http://www.bioscipub.com/journals/abi/pdf/527-535.pdf>.
74. Venables, W. y Ripley, B. (2002). *Modern Applied Statistics with S* (Fourth Edition). New York: Springer. Recuperado de <https://cran.r-project.org/web/packages/MASS/MASS.pdf>.
75. Vera, M. (2008). *Estudio Fitoquímico de una Planta de la Flora del Ecuador: Ambrosia arborescens* (Disertación de Pregrado). Escuela Politécnica del Ejército, Quito, Ecuador.

76. World Health Organization (WHO). (2005). Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. *World Health Organization*, 1–41. doi: WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.11.
77. World Health Organization (WHO) y Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). (2009). *Dengue Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control*. Switzerland: WHO publications.
78. Wink, M. (2000). *Interference of alkaloids with neuroreceptors and ion channels*. Studies in Natural Products Chemistry. New York: Elsevier.
79. Yúfera, E. (1995). *Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria*. Madrid: Reverté. Recuperado de [https://books.google.com.ec/books?id=aU\\_aBXvAB3MC](https://books.google.com.ec/books?id=aU_aBXvAB3MC)

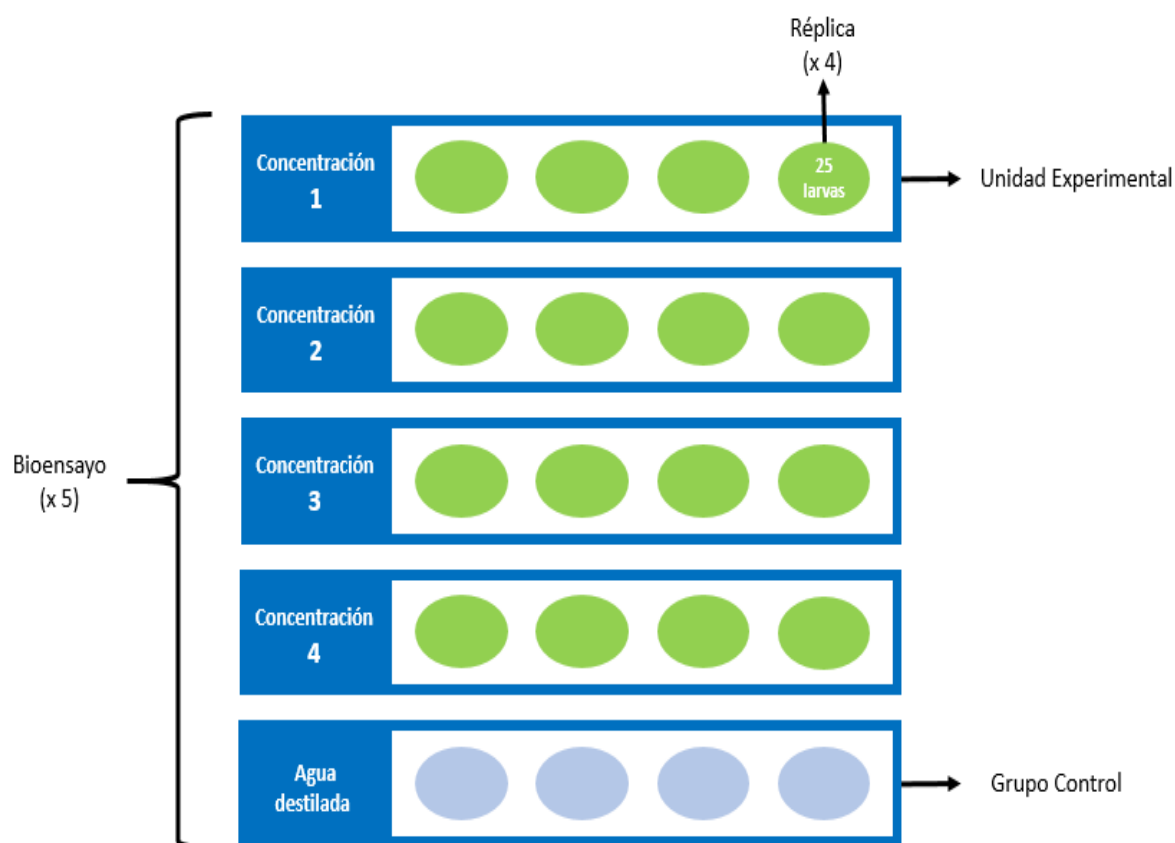
## 9. FIGURAS



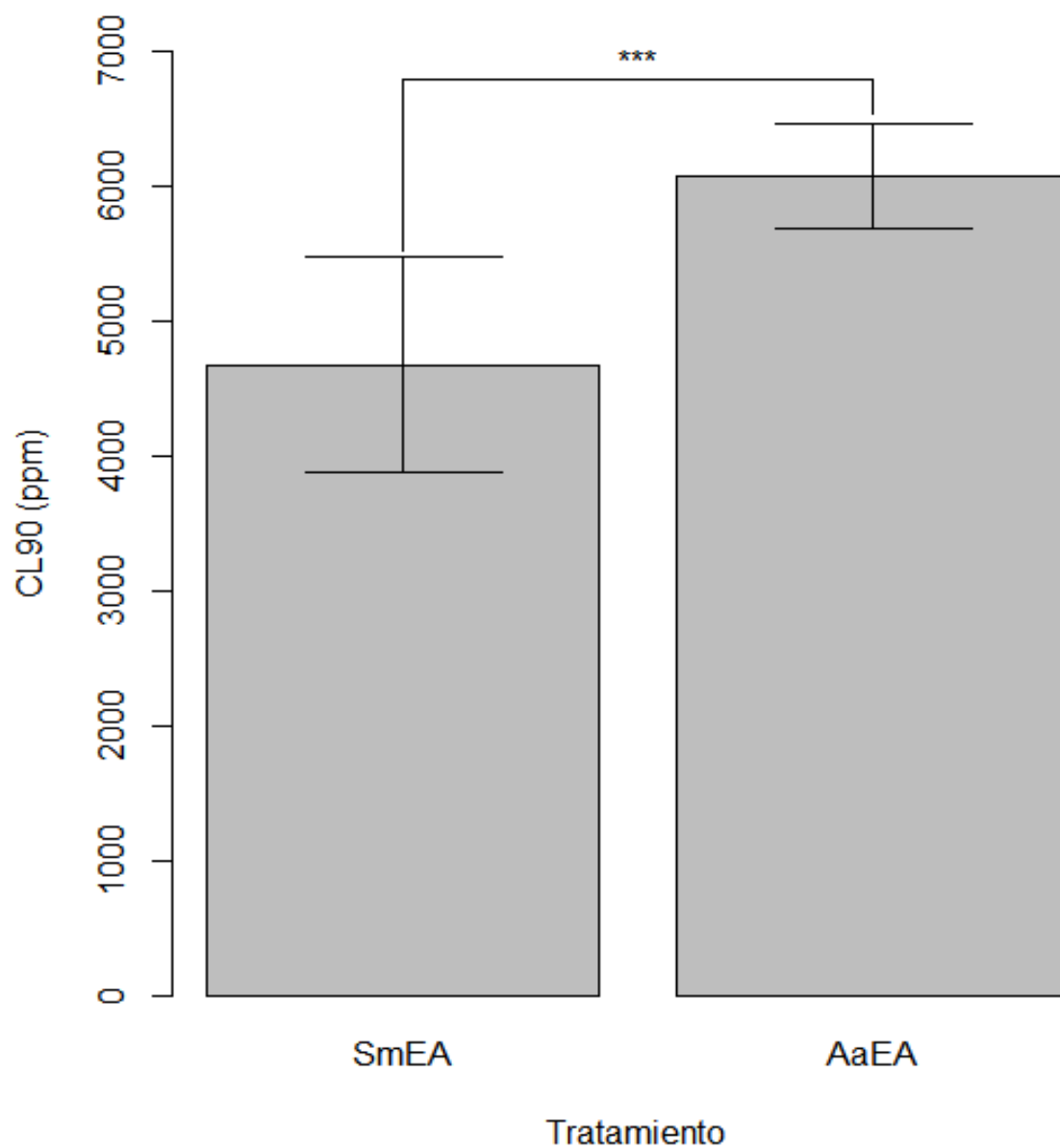
**Figura 1.** Voucher de *Solanum mammosum* L. depositado en el Centro de Investigación para la Salud en América Latina.



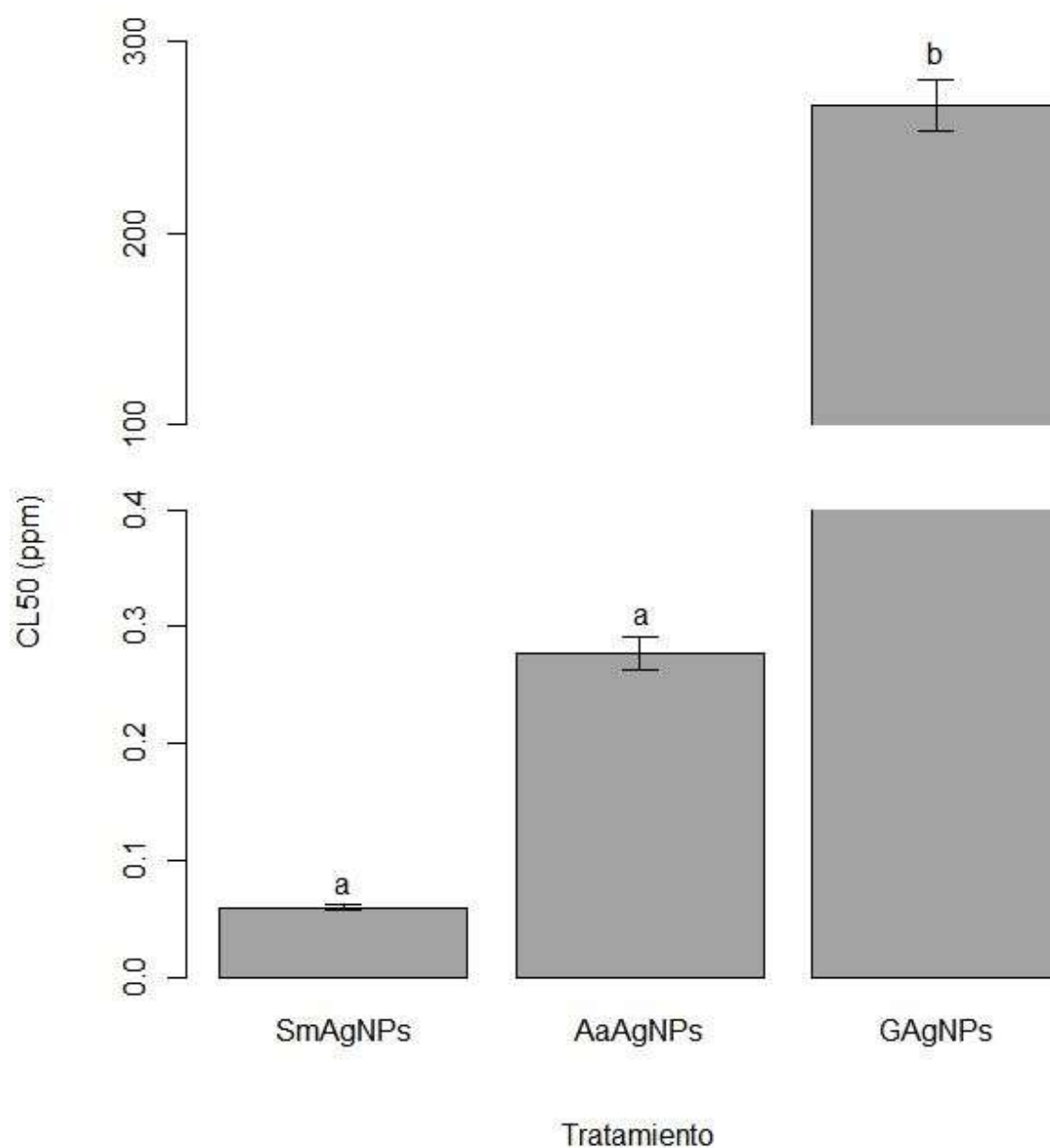
Figura 2. Voucher de *Ambrosia arborescens* Mill. depositado en el Centro de Investigación para la Salud en América Latina.



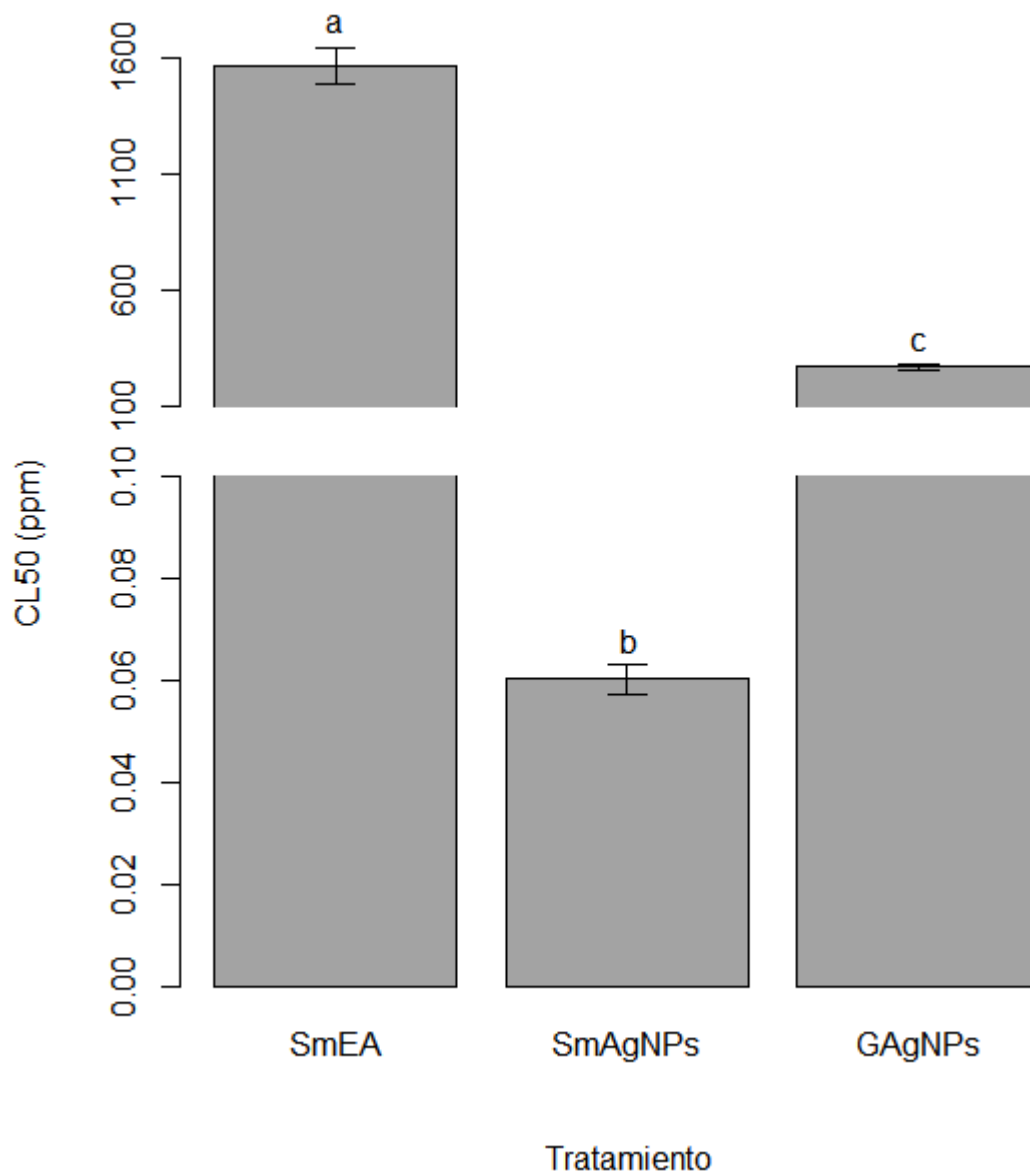
**Figura 3.** Esquema de bioensayo para determinar la concentración letal media de extractos vegetales o nanopartículas de plata en las larvas de *Aedes aegypti*. Cada bioensayo consta de una unidad experimental por cada concentración y un grupo control. Se realizaron cinco réplicas de cada bioensayo. La unidad experimental consiste de cuatro réplicas; cada réplica consta de 25 larvas en estadio L3, ubicadas en un contenedor y expuestas a la solución de prueba. El grupo control es similar a una unidad experimental, pero está expuesto únicamente a agua destilada.



**Figura 4.** Actividad larvicida de extractos vegetales acuosos obtenidos a partir de *Solanum mammosum* y *Ambrosia arborescens* contra *Aedes aegypti*. SmEA, extracto acuoso de *Solanum mammosum*; y AaEA, extracto de *Ambrosia arborescens*. Los resultados representan las medias de cinco bioensayos independientes (t-test, \*\*\*  $p < 0.001$ ). Las barras de error representan el error estándar

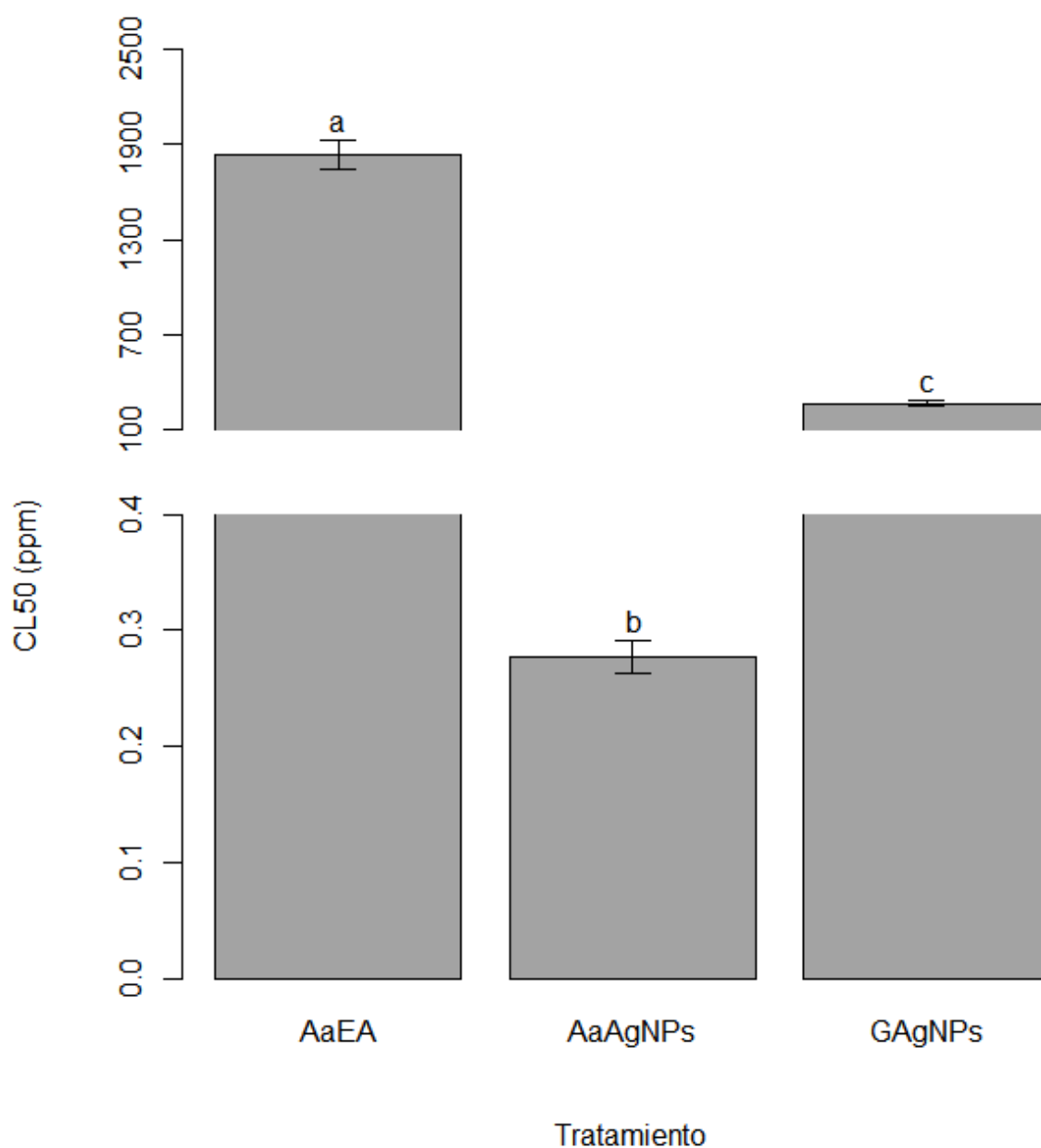


**Figura 5.** Actividad larvica de nanopartículas de plata sintetizadas a partir de los extractos vegetales de *Solanum mammosum*, *Ambrosia arborescens* y nanopartículas control contra *Aedes aegypti*. SmAgNPs; nanopartículas de plata (AgNPs) obtenidas a partir de *S. mammosum*; AaAgNPs; AgNPs sintetizadas a partir de *A. arborescens*; GAgNPs, AgNPs control obtenidas a partir de d-glucosa y almidón. Los resultados representan las medias de cinco bioensayos independientes (ANOVA, seguido de una prueba de significación de Tukey; los valores de las medias que comparten la misma letra no son significativamente diferentes). Las barras de error representan el error estándar.



**Figura 6.** Actividad larvicida de extractos vegetales y nanopartículas de plata obtenidas a partir de *Solanum mammosum* y nanopartículas control contra *Aedes aegypti*. SmEA, extracto acuoso de *S. mammosum*; SmAgNPs, nanopartículas de plata (AgNPs) sintetizadas a partir de *S. mammosum*; GAgNPs, AgNPs control obtenidas a partir de d-glucosa y almidón. Los resultados representan las medias de cinco bioensayos independientes (ANOVA, seguido de una prueba de significación de Tukey; los valores de las medias que comparten la misma letra no son significativamente diferentes). Las barras de error representan el error estándar.





**Figura 7.** Actividad larvicida de extractos vegetales y nanopartículas de plata obtenidas a partir de *Ambrosia arborescens* y nanopartículas control contra *Aedes aegypti*. AaEA, extracto acuoso de *A. arborescens*; AaAgNPs, nanopartículas de plata (AgNPs) sintetizadas a partir de *A. arborescens*; GAgNPs, AgNPs control obtenidas a partir de d-glucosa y almidón. Los resultados representan las medias de cinco bioensayos independientes (ANOVA, seguido de una prueba de significación de Tukey; los valores de las medias que comparten la misma letra no son significativamente diferentes). Las barras de error representan el error estándar.

## 10. TABLAS

**Tabla 1. Valores probit de extractos vegetales y nanopartículas de plata obtenidas a partir de *Solanum mammosum*, *Ambrosia arborescens* y nanopartículas control contra las larvas de *Aedes aegypti*.**

Tratamiento		CL <sub>50</sub> (ppm)	Intervalo de confianza (95%)
<i>Solanum mammosum</i>	Extracto vegetal acuoso	1559.37	827.09 - 2036.18
	AgNPs	0.06	0.05 - 0.063
<i>Ambrosia arborescens</i>	Extracto vegetal acuoso	1836.97	1255.70 - 2036.18
	AgNPs	0.28	0.26 - 0.29
Glucosa- almidón	AgNPs	266.95	252.34 - 280.78

AgNPs, nanopartículas de plata; CL<sub>50</sub>, concentración letal que mata el 50% de las larvas expuestas.

**Tabla 2. Registro de mortalidad de larvas de *Aedes aegypti* expuestas a diferentes concentraciones de extracto vegetal obtenido a partir de *Solanum mammosum* y concentraciones letales medias calculadas por bioensayo.**

Fecha	Réplica	No. de larvas muertas en 24 horas					Concentraciones letales calculadas	
		Extracto vegetal				Control		
		1500 ppm	3000 ppm	4500 ppm	6000 ppm	dH <sub>2</sub> O	CL <sub>50</sub> (ppm)	IC
19/08/2016	1	16	20	22	24	0	1402.45	1060.43-1685.89
	2	14	20	23	23	0		
	3	9	22	22	23	0		
	4	13	21	22	25	0		
	Subtotal 1	52	83	89	95	0		
09/09/2016	5	13	19	22	25	0	1717.26	1385.78-1998,32
	6	11	16	23	24	0		
	7	10	18	19	23	0		
	8	11	20	20	23	0		
	Subtotal 2	45	73	84	95	0		
08/10/2016	9	13	22	22	25	0	1491.03	240.08 – 2221.37
	10	11	19	21	25	0		
	11	15	23	25	25	0		
	12	13	17	23	25	0		
	Subtotal 3	52	81	91	100	0		
26/12/2016	13	12	21	22	24	0	1621.94	186.09 – 2455.07
	14	9	18	21	25	0		
	15	13	19	22	24	0		
	16	14	18	20	25	0		
	Subtotal 4	48	76	85	98	0		
27/12/2016	17	14	20	23	24	0	1564.85	1263.05 – 1820.23
	18	10	18	22	24	0		
	19	11	21	23	24	0		
	20	14	19	22	25	0		
	Subtotal 5	49	78	90	97	0		
	TOTAL	246	391	439	485	0	media CL <sub>50</sub>	SD
	% mortalidad	49.20	78.20	87.80	97.00	0.00	1559.37	120.50
	SD	2.9	4.0	3.1	2.1	0.0	CV (%)	7.73

CL<sub>50</sub>, concentración letal que mata el 50% de las larvas expuestas; IC, intervalo de confianza (95%); SD, desviación estándar (representada a partir de cinco bioensayos); CV, coeficiente de variación.

**Tabla 3. Registro de mortalidad de larvas de *Aedes aegypti* expuestas a diferentes concentraciones de extracto vegetal obtenido a partir de *Ambrosia arborescens* y concentraciones letales medias calculadas por bioensayo.**

Fecha	Réplica	No. de larvas muertas en 24 horas					Concentraciones letales calculadas	
		Extracto vegetal				Control dH <sub>2</sub> O	CL <sub>50</sub> (ppm)	IC
		1500 ppm	3000 ppm	4500 ppm	6000 ppm			
26/08/2016	1	9	17	24	25	0	1614.44	1198.93- 1953.12
	2	16	14	23	20	0		
	3	13	20	19	23	0		
	4	11	18	16	23	0		
	Subtotal 1	49	69	82	91	0		
23/09/2016	5	10	18	21	24	0	1929.51	1580.14 – 2228.49
	6	12	15	22	25	0		
	7	9	13	20	23	0		
	8	11	18	17	21	0		
	Subtotal 2	42	64	80	93	0		
08/10/2016	9	9	18	22	25	0	2032.81	1734.39 – 2297.94
	10	11	14	19	25	0		
	11	8	17	21	23	0		
	12	8	19	20	21	0		
	Subtotal 3	36	68	82	94	0		
26/12/2016	13	12	16	21	23	0	1854.32	395.53 – 2733.58
	14	11	18	18	24	0		
	15	9	17	22	22	0		
	16	12	14	20	25	0		
	Subtotal 4	44	65	81	94	0		
27/12/2016	17	10	18	22	21	0	1753.75	1369.47 – 2073.69
	18	14	16	20	23	0		
	19	12	18	20	24	0		
	20	10	15	19	24	0		
	Subtotal 5	46	67	81	92	0		
	TOTAL	217	333	406	464	0	media CL <sub>50</sub>	SD
	% mortalidad	43.40	66.60	81.20	92.80	0.00	1836.97	160.98
	SD	4.9	2.1	0.8	1.3	0.0	CV (%)	8.76

CL<sub>50</sub>, concentración letal que mata el 50% de las larvas expuestas; IC, intervalo de confianza (95%); SD, desviación estándar (representada a partir de cinco bioensayos); CV, coeficiente de variación.

**Tabla 4. Registro de mortalidad de larvas de *Aedes aegypti* expuestas a diferentes concentraciones de nanopartículas de plata sintetizadas a partir de *Ambrosia arborescens* y concentraciones letales medias calculadas por bioensayo.**

Fecha	Réplica	No. de larvas muertas en 24 horas					Concentraciones letales calculadas	
		AgNPs				Control	CL <sub>50</sub> (ppm)	IC
		0.05 ppm	0.06 ppm	0.07 ppm	0.08 ppm	dH <sub>2</sub> O		
15/03/2017	1	4	18	17	25	0	0.06	0.058 – 0.062
	2	3	14	19	20	0		
	3	7	12	20	23	0		
	4	6	11	16	23	0		
	Subtotal 1	20	55	72	91	0		
21/03/2017	5	3	13	18	18	0	0.061	0.059 – 0.063
	6	6	13	15	24	0		
	7	5	9	18	25	0		
	8	5	15	16	22	0		
	Subtotal 2	19	50	67	89	0		
22/03/2017	9	4	15	19	24	0	0.06	0.053 – 0.066
	10	2	9	20	25	0		
	11	5	13	18	24	0		
	12	6	11	18	25	0		
	Subtotal 3	17	48	75	98	0		
28/03/2017	13	6	12	19	24	0	0.06	0.058 – 0.062
	14	3	16	17	21	0		
	15	4	14	20	25	0		
	16	6	11	15	23	0		
	Subtotal 4	19	53	71	93	0		
29/03/2017	17	6	15	15	25	0	0.06	0.058 – 0.062
	18	2	10	21	24	0		
	19	7	11	19	25	0		
	20	5	13	20	22	0		
	Subtotal 5	20	49	75	96	0		
	TOTAL	95	255	360	467	0	media CL <sub>50</sub>	SD
	% mortalidad	19.00	51.00	72.00	93.40	0.00	0.06	0.0004
	SD	1.2	2.9	3.3	3.6	0.0	CV (%)	0.74

AgNPs, nanopartículas de plata; CL<sub>50</sub>, concentración letal que mata el 50% de las larvas expuestas; IC, intervalo de confianza (95%); SD, desviación estándar (representada a partir de cinco bioensayos); CV, coeficiente de variación.

**Tabla 5. Registro de mortalidad de larvas de *Aedes aegypti* expuestas a diferentes concentraciones de nanopartículas de plata sintetizadas a partir de *Ambrosia arborescens* y concentraciones letales medias calculadas por bioensayo.**

Fecha	Réplica	No. de larvas muertas en 24 horas					Concentraciones letales calculadas	
		AgNPs				Control		
		0.2 ppm	0.3 ppm	0.4 ppm	0.5 ppm	dH <sub>2</sub> O	CL <sub>50</sub> (ppm)	IC
22/12/2016	1	3	14	24	25	0	0.29	0.27 – 0.31
	2	5	15	21	22	0		
	3	4	11	18	23	0		
	4	3	16	16	24	0		
	Subtotal 1	15	56	79	94	0		
07/01/2017	5	3	15	21	23	0	0.28	0.26 – 0.29
	6	6	17	21	24	0		
	7	3	16	21	24	0		
	8	4	15	23	24	0		
	Subtotal 2	16	63	86	95	0		
08/01/2017	9	5	16	21	24	0	0.27	0.25 – 0.29
	10	5	14	20	25	0		
	11	6	16	22	24	0		
	12	7	13	19	24	0		
	Subtotal 3	23	59	82	97	0		
14/01/2017	13	4	15	21	23	0	0.27	0.26 – 0.29
	14	3	17	18	25	0		
	15	5	15	23	25	0		
	16	4	17	22	25	0		
	Subtotal 4	16	64	84	98	0		
15/01/2017	17	5	16	20	25	0	0.28	0.26 – 0.29
	18	3	17	20	24	0		
	19	5	15	21	24	0		
	20	5	13	21	25	0		
	Subtotal 5	18	61	82	98	0		
	TOTAL	88	303	413	482	0	media CL <sub>50</sub>	SD
	% mortalidad	17.60	60.60	82.60	96.40	0.00	0.28	0.007
	SD	3.2	3.2	3.1	1.8	0.0	CV (%)	2.67

AgNPs, nanopartículas de plata; CL<sub>50</sub>, concentración letal que mata el 50% de las larvas expuestas; IC, intervalo de confianza (95%); SD, desviación estándar (representada a partir de cinco bioensayos); CV, coeficiente de variación.

**Tabla 6. Registro de mortalidad de larvas de *Aedes aegypti* expuestas a diferentes concentraciones de nanopartículas de plata control sintetizadas a partir de d-glucosa y almidón y concentraciones letales medias calculadas por bioensayo.**

Fecha	Réplica	No. de larvas muertas en 24 horas					Concentraciones letales calculadas	
		AgNPs				Control	CL <sub>50</sub> (ppm)	IC
		200 ppm	300 ppm	400 ppm	500 ppm	dH <sub>2</sub> O		
15/03/2017	1	3	18	22	25	0	266.78	252.40 – 280.43
	2	6	12	24	25	0		
	3	4	15	21	25	0		
	4	6	19	20	25	0		
	Subtotal 1	19	64	87	100	0		
21/03/2017	5	3	16	23	25	0	257.73	243.05 – 271.46
	6	7	19	22	25	0		
	7	4	14	21	25	0		
	8	8	20	22	25	0		
	Subtotal 2	22	69	88	100	0		
22/03/2017	9	2	18	20	24	0	276.33	261.63 – 290.39
	10	5	14	23	25	0		
	11	4	16	23	25	0		
	12	5	13	18	25	0		
	Subtotal 3	16	61	84	99	0		
28/03/2017	13	7	12	19	25	0	268.86	253.45 – 283.37
	14	3	17	23	25	0		
	15	4	15	24	25	0		
	16	6	19	18	24	0		
	Subtotal 4	20	63	84	99	0		
29/03/2017	17	6	16	21	25	0	265.04	251.17 – 278.24
	18	5	18	25	25	0		
	19	2	19	23	25	0		
	20	5	13	20	25	0		
	Subtotal 5	18	66	89	100	0		
	TOTAL	95	323	432	498	0	media CL <sub>50</sub>	SD
	% mortalidad	19.00	64.60	86.40	99.60	0.00	266.95	6.71
	SD	2.2	3.0	2.3	0.5	0.0	CV (%)	2.52

AgNPs, nanopartículas de plata; CL<sub>50</sub>, concentración letal que mata el 50% de las larvas expuestas; IC, intervalo de confianza (95%); SD, desviación estándar (representada a partir de cinco bioensayos); CV, coeficiente de variación.

**Tabla 7.** Porcentaje de mortalidad en larvas de *Aedes aegypti* expuestas a diferentes concentraciones de extracto vegetal acuoso y nanopartículas de plata obtenidos a partir de *Solanum mammosum* y *Ambrosia arborescens*.

Tratamiento		Dosis (ppm)	Mortalidad a las 24 h (%) $\pm$ SD
<i>Solanum mammosum</i>	Extracto vegetal acuoso	1500	49.2 $\pm$ 2.9
		3000	7.2 $\pm$ 4.0
		4500	87.8 $\pm$ 3.1
		6000	97.0 $\pm$ 2.1
	Control	0	0 $\pm$ 0.0
	AgNPs	0.05	19 $\pm$ 1.2
		0.06	51 $\pm$ 2.9
		0.07	72 $\pm$ 3.3
		0.08	93.4 $\pm$ 3.6
	Control	0	0 $\pm$ 0.0
<i>Ambrosia arborescens</i>	Extracto vegetal acuoso	1500	43.4 $\pm$ 4.9
		3000	66.6 $\pm$ 2.1
		4500	81.2 $\pm$ 0.8
		6000	92.8 $\pm$ 1.3
	Control	0	0 $\pm$ 0.0
	AgNPs	0.2	17.6 $\pm$ 3.2
		0.3	60.6 $\pm$ 3.2
		0.4	82.6 $\pm$ 3.1
		0.5	96.4 $\pm$ 1.8
	Control	0	0 $\pm$ 0.0
Glucosa-almidón	AgNPs	200	19 $\pm$ 2.2
		300	64.6 $\pm$ 3.0
		400	86.4 $\pm$ 2.3
		500	99.6 $\pm$ 0.5
	Control	0	0 $\pm$ 0

AgNPs, nanopartículas de plata; SD, desviación estándar. Los resultados representan las medias  $\pm$  SD de cinco bioensayos independientes.



## 11. ANEXOS

### Anexo 1. Régimen de alimentación larval de *Aedes aegypti* desde L1 hasta L3.

Día	1 (alícuota)	2	3	4
Cantidad de alimento (g)	0.03	-	0.04	0.08

Día 1 (alícuota), 24 horas después de la eclosión se forman alícuotas de 500 larvas L1 en 250 mL de agua destilada. Modificado a partir de Carvalho et al., 2014.

## Anexo 2. Script para análisis probit en R.

```
#cargar paquete
>library(MASS)

#ingresar datos
>dosis <- c(concentración 1, concentración 2, concentración 3, concentración 4, control)
>total <- c(100, 100, 100, 100, 100)
>afectados <- c(no. muertos 1, no. muertos 2, no. muertos 3, no. muertos 4, no. muertos en
control)

# crear data frame
>finney71.1 <- data.frame(dosis, total, afectados)

# regresión probit
>fm1 <- glm(afectados/total ~ log(dosis),
+ family=binomial(link = probit), data=finney71.1[finney71.1$dosis != 0, ])

#mostrar resumen de resultados de regresión
>summary(fm1)$coef

#transformar en valores de CL50 y determinar intervalo de confianza
>xp1.1 <- dose.p(fm1, p=c(0.5))
>xp.ci1.1 <- xp1.1 + attr(xp1.1, "SE") %*% matrix(qnorm(1 - 0.05/2)*c(-1,1), nrow=1)
+ CL1.1 <- exp(cbind(xp1.1, attr(xp1.1, "SE"), xp.ci1.1[,1], xp.ci1.1[,2]))
+dimnames(CL1.1)[[2]] <- c("LD", "SE", "LCL","UCL")
>CL1.1 <- exp(cbind(xp1.1, attr(xp1.1, "SE"))) dimnames(CL1.1)[[2]] <- c("LD", "SE"))

#mostrar resultado de CL50 e intervalo de confianza
>CL1.1
```

**Anexo 3. Script para t-test para muestras independientes.**

```
#ingresar datos
```

```
>Larvicida1 = c(CL1, CL2, CL3, CL4, CL5)
```

```
>Larvicida2 = c(CL1, CL2, CL3, CL4, CL5)
```

```
#t-test
```

```
>t.test(Larvicida1, Larvicida2)
```

**Anexo 4. Script para ANOVA y prueba de significación (post hoc) de HSD Tukey.**

```
#ingresar datos
```

```
> Larvicida1<- c(CL1, CL2, CL3, CL4, CL5)
```

```
> Larvicida2<- c(CL1, CL2, CL3, CL4, CL5)
```

```
> Larvicida3<- c(CL1, CL2, CL3, CL4, CL5)
```

```
#crear dataframe
```

```
> Datos<- c(Larvicida1, Larvicida2, Larvicida3)
```

```
> Tratamiento<- rep(1:3, each=5)
```

```
> Tratamiento<- factor (Tratamiento)
```

```
> Tratamiento <- gl(3, 5)
```

```
> split(Datos, Tratamiento)
```

```
#ANOVA I
```

```
> p.aov <- aov(Datos ~ Tratamiento)
```

```
#mostrar resumen de resultados de ANOVA
```

```
> summary(p.aov)
```

```
#cargar paquete
```

```
>library(agricolae)
```

```
#prueba de significación de Tukey
```

```
>posthoc<- HSD.test(p.aov, "Tratamiento")
```

```
#mostrar resultado de prueba de significación de Tukey
```

```
>posthoc
```

## DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Bianca Dominique Morejón Viteri, con CC. 1727155176, autora del trabajo de graduación intitulado “Evaluación de la actividad larvica de extractos vegetales y nanopartículas de plata sintetizadas a partir de extractos vegetales de especies nativas del Ecuador contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae).”, previa a la obtención del grado académico de LICENCIADA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENECYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 27 de julio de 2017.

Bianca Morejón  
CC: 1727155176